

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der
Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz
Justus-Liebig-Universität Gießen

**Untersuchungen zum Vorkommen von Wachstumsfaktoren
(aFGF, bFGF, TGF- α) und deren Rezeptoren (FGF-R,
EGF-R) in der Plazenta des Rindes**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
SIMONE WEISE

Gießen 2001

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der
Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz
Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. B. Hoffmann

**Untersuchungen zum Vorkommen von Wachstumsfaktoren
(aFGF, bFGF, TGF- α) und deren Rezeptoren (FGF-R,
EGF-R) in der Plazenta des Rindes**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
SIMONE WEISE
Tierärztin aus Siegen

Gießen 2001

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Hoffmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Leiser

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2001

Oh glücklich, wer noch hoffen kann,
aus diesem Meer des Irrtums aufzutauchen!
Was man nicht weiß, das eben brauchte man,
und was man weiß, kann man nicht brauchen.
(J. W. von Goethe, *Faust*, *Der Tragödie erster Teil*)

Meinen Eltern und mir

INHALT

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT	5
2.1	PLAZENTAMORPHOLOGIE	5
2.1.1	<i>Rinderplazenta</i>	5
2.2	WACHSTUMSFAKTOREN.....	9
2.2.1	<i>Fibroblast Growth Factor (FGF)</i>	10
2.2.1.1	acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF)	14
2.2.1.2	basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	17
2.2.2	<i>Transforming Growth Factor-α (TGF-α)</i>	24
2.3	WACHSTUMSFAKTOR-REZEPTOREN	30
2.3.1	<i>Fibroblast Growth Factor-Rezeptor (FGF-R)</i>	32
2.3.2	<i>Epidermal Growth Factor-Rezeptor (EGF-R)</i>	35
3	MATERIAL UND METHODEN	43
3.1	IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN	43
3.1.1	<i>Allgemeine Grundlagen</i>	43
3.1.1.1	Begriffe	43
3.1.2	<i>Möglichkeiten zur Darstellung der Ag-AK-Reaktion</i>	44
3.1.2.1	Direkte Methoden	44
3.1.2.2	Indirekte Methoden	44
3.1.3	<i>Lokalisation der Ag-AK-Reaktion</i>	46
3.1.4	<i>Gewebepräparation</i>	46
3.1.4.1	Paraffineinbettung	47
3.1.4.2	Kryostatpräparation	47
3.1.5	<i>Probleme des immunhistologischen Antigen-Nachweises</i>	48
3.1.5.1	Durch die Gewebepräparation bedingte Probleme.....	48
3.1.5.2	Hintergrundreaktivität	49
3.2	EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....	51
3.2.1	<i>Gewinnung und Fixierung des Probenmaterials</i>	51
3.2.1.1	Plazentome	51
3.2.1.2	Kontrollgewebe.....	52
3.2.2	<i>Einbettung des Probenmaterials</i>	52
3.2.2.1	Plazentome	52
3.2.2.2	Kontrollgewebe.....	53
3.2.3	<i>Herstellung der Gewebeschnitte</i>	53
3.2.3.1	Objektträgerbeschichtung	53
3.2.3.2	Schneiden der Proben	53
3.2.4	<i>Herstellung und Lagerung der verwendeten Lösungen</i>	54
3.2.4.1	Blutsera für die Herstellung der Blockierlösungen.....	54
3.2.4.2	Primärantikörper (AK I).....	54
3.2.4.3	Sekundärantikörper (AK II)	55
3.2.4.4	Avidin-Biotin-Komplex	55
3.2.4.5	Sonstige Puffer und Lösungen	55
3.2.5	<i>Immunhistochemisches Nachweisverfahren</i>	55
3.2.6	<i>Vorversuche zur Optimierung der immunhistochemischen Nachweisreaktionen</i>	56
3.2.6.1	Untersuchungen zum Einfluß der Lagerungsbedingungen der Gewebeschnitte auf das Färbeverhalten	56
3.2.6.2	Ermittlung der optimalen Verdünnungen der AK I, AK II und des ABC-Komplexes.....	57
3.2.6.3	Untersuchungen zur Dämpfung der Hintergrundreaktivität	57
3.2.6.4	Untersuchungen zur Demaskierung gesuchter Epitope	59
3.2.7	<i>Allgemeine Beschreibung der Versuche</i>	59
3.2.8	<i>Immunhistologische Nachweise</i>	61
3.2.8.1	Immunhistologischer Nachweis von aFGF	61
3.2.8.2	Immunhistologischer Nachweis von bFGF	62
3.2.8.3	Immunhistologischer Nachweis von TGF- α	64
3.2.8.4	Immunhistologischer Nachweis des FGF-Rezeptors.....	65
3.2.8.5	Immunhistologischer Nachweis des EGF-Rezeptors	66
3.2.9	<i>Auswertung</i>	67
3.2.9.1	Auswahl der Präparate für die Hauptversuche	67
3.2.9.2	Auswertung der immunhistologisch gefärbten Gewebeschnitte im Hauptversuch	68
3.2.9.3	Aufnahme der Bilder.....	70

4	ERGEBNISSE	71
4.1	IMMUNHISTOLOGISCHER NACHWEIS DER WACHSTUMSFAKTOREN	71
4.1.1	<i>Nachweis von aFGF</i>	71
4.1.1.1	Darstellung der histologischen Präparate mit immunhistologischem Nachweis von aFGF	72
4.1.2	<i>Nachweis von bFGF</i>	79
4.1.2.1	Verfahren 1 unter Verwendung des monoklonalen AK (Maus anti Rinder bFGF IgG1 κ)	79
4.1.2.2	Verfahren 2 unter Verwendung des polyklonalen AK (Kaninchen anti Rinder bFGF-Faktor)	84
4.1.2.3	Vergleich der Immunreaktionen beider gegen bFGF gerichteter Antikörper	94
4.1.3	<i>Nachweis von TGF-α</i>	95
4.2	IMMUNHISTOLOGISCHER NACHWEIS DER WACHSTUMSFAKTOR-REZEPTOREN	95
4.2.1	<i>Nachweis des FGF-Rezeptors (FGF-R)</i>	95
4.2.1.1	Darstellung der histologischen Präparate mit immunhistologischem Nachweis des FGF-Rezeptors	97
4.2.2	<i>Nachweis des EGF-Rezeptors (EGF-R)</i>	104
4.2.2.1	Darstellung der histologischen Präparate mit immunhistologischem Nachweis des EGF-Rezeptors	105
5	DISKUSSION	114
5.1	DISKUSSION DER METHODIK	114
5.1.1	<i>Allgemeine Aspekte</i>	114
5.1.2	<i>Spezielle Aspekte zum immunhistologischen Nachweis von aFGF</i>	116
5.1.3	<i>Spezielle Aspekte zum immunhistologischen Nachweis von bFGF</i>	117
5.1.4	<i>Spezielle Aspekte zum immunhistologischen Nachweis von TGF-α</i>	118
5.1.5	<i>Spezielle Aspekte zum immunhistologischen Nachweis des FGF-Rezeptors (FGF-R)</i>	119
5.1.6	<i>Spezielle Aspekte zum immunhistologischen Nachweis des EGF-Rezeptors (EGF-R)</i>	121
5.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	121
5.2.1	<i>Immunhistologischer Nachweis von aFGF</i>	121
5.2.2	<i>Immunhistologischer Nachweis von bFGF</i>	125
5.2.3	<i>Immunhistologischer Nachweis des FGF-Rezeptors (FGF-R)</i>	129
5.2.4	<i>Immunhistologischer Nachweis des EGF-Rezeptors (EGF-R)</i>	130
6	ZUSAMMENFASSUNG	134
7	SUMMARY	137
8	LITERATURVERZEICHNIS	139
9	ANHANG	162
9.1	GERÄTE, REAGENZIEEN, PUFFER UND LÖSUNGEN	162
9.1.1	<i>Geräte</i>	162
9.1.2	<i>Reagenzien</i>	163
9.1.2.1	Chemikalien	163
9.1.2.2	Antikörper und Sera	166
9.1.3	<i>Puffer und Lösungen</i>	168
9.2	TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOLOGISCHEN NACHWEISREAKTIONEN	171
9.2.1	<i>Immunhistologischer Nachweis der Wachstumsfaktoren</i>	171
9.2.1.1	Nachweis von aFGF	171
9.2.1.2	Nachweis von bFGF	174
9.2.2	<i>Immunhistologischer Nachweis der Wachstumsfaktor-Rezeptoren</i>	182
9.2.2.1	Nachweis des FGF-Rezeptors	182
9.2.2.2	Nachweis des EGF-Rezeptors	186
10	DANKSAGUNG	190

Abkürzungen

A. dest.	Aqua destillata = destilliertes Wasser
ABC	A vidin- B iotin- C omplex
AEC	3- A mino-9- e thyl c arbazol
aFGF	a cidic f ibroblast g rowth f actor
Ag	A ntigen
AK	A ntikörper
AK I	Primärantikörper
AK II	Sekundärantikörper
APES	3- A minopropyltriethoxy- s ilan, $C_9H_{23}NO_3Si$
ATP	A denosin t riphosphat
bFGF	b asic f ibroblast g rowth f actor
BNC	b inucleate trophoblast giant c ell = binukleäre Trophoblastriesenzelle
BSA	b ovines S erum a lbumin
C.I.	C orpus luteum
DAB	3,3'- D iaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DNA	d esoxy ribonucleic a cid = Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazellulär m atrix
EGF	e pidermal g rowth f actor
EGF-R	e pidermal g rowth f actor r eceptor
FGF	f ibroblast g rowth f actor
FGF-R	f ibroblast g rowth f actor r eceptor
GAG	G lykosaminoglykan
GF	g rowth f actor
HER	h uman e pidermal growth factor receptor
hCG	h umanes C horion g onadotropin
HCl	Salzsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HSPG	H eparansulfat p roteoglykan
Ig	I mmunglobulin
IGF	I nsulin like g rowth f actor
Kb	K ilobasen
kDa	K ilodalton
LAB-Technik	labelled- a vidin- b iotin technique
LH	luteotropes H ormon
mAK	m onoklonaler A ntikörper
mRNA	m essenger ribonucleic a cid
NaOH	Natriumhydroxid
NK	Negativkontrolle
NLS	n uclear l ocalization s equences = Kerntranslokationssequenz
OT	Objektträger
pAK	p olyklonaler A ntikörper
PBS	p hosphate b uffered s aline = Phosphatpuffer
PDGF	P latelet d erived g rowth f actor
PGF _{2α}	P rostaglandin F _{2α}
post insem. = p. i.	post inseminationem = nach der Besamung
Rd	R ind
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
TGF-α:	transforming g rowth f actor α

1 Einleitung

Bei allen Mitgliedern der Unterklasse Placentalia aus der großen Klasse der Säugetiere bilden die Weibchen nach erfolgreicher Befruchtung und Wanderung des Keimes in den Uterus eine Plazenta aus. Dieses hochspezialisierte Organ entwickelt sich in den Bereichen, in denen die fetalen Häute in engen Kontakt mit der Uterusschleimhaut treten bzw. mit dieser fusionieren, und dient dem fetomaternalen Stoffaustausch. Nach Erfüllung ihrer Aufgaben wird die Plazenta am Ende der Trächtigkeit zurückgebildet bzw. mit den Eihäuten und den Früchten ausgeschieden. Es handelt sich also um ein temporäres Organ, welches eine Grundvoraussetzung für die Aufrechterhaltung und erfolgreiche Beendigung der Gravidität ist. Ungeachtet der einheitlichen und immer gleichen Aufgabe bzw. Zielsetzung dieses Organes, hat sich im Laufe der Evolution in verschiedenen Spezies ein ausgesprochen breites Spektrum an Plazentationsformen entwickelt, die sich sowohl in ihrer morphologischen Struktur, als auch - soweit bisher untersucht - in ihren einzelnen Funktionen unterscheiden (MOSSMAN, 1987; TALAMANTES und OGREN, 1988; LEISER und KAUFMANN, 1994).

Zur Erfüllung ihrer vielfältigen Funktionen muß die Plazenta vom Zeitpunkt der Entstehung bis zu ihrer termingerechten Ausstoßung nach der Geburt auf die sich stetig ändernden Anforderungen in adäquater Weise reagieren können. Dazu ist es notwendig, daß alle Wachstums- und Differenzierungsvorgänge in den entsprechenden anatomischen und funktionellen Untereinheiten der Plazenta optimal aufeinander abgestimmt werden. Dieses geschieht durch eine sehr komplexe interzelluläre „Sprache“, welche bis heute nur wenig erforscht ist. In vorwiegend an Plazenten von Labornagern und Menschen durchgeführten Untersuchungen wurden zahlreiche Wachstumsfaktoren incl. ihrer Rezeptoren nachgewiesen und deren Bedeutung für die Regulation bestimmter Plazentafunktionen, sowie Zellproliferation und -differenzierung und Invasivität des Trophoblasten postuliert. Entsprechende Untersuchungen an der Rinderplazenta fehlen fast vollständig. Ein ungeprüftes Übertragen der bereits bei anderen Spezies gewonnenen Erkenntnisse ist nicht möglich, da nicht nur die morphologische Vielfalt der Plazenten, sondern auch die bisher zur endokrinen Funktion gewonnenen Erkenntnisse erhebliche speziesspezifische Unterschiede hinsichtlich des Wachstums und der Differenzierung dieses Organes erwarten lassen.

Dennoch ist anzunehmen, daß die Steuerung in erster Linie autonom gemäß dem genetischen Programm des fetalen Trophoblasten durch auto-, juxta- und parakrine Mechanismen erfolgt. Eine herausragende Bedeutung für die Koordination von Wachstums- und Differenzierungsprozessen haben die sogenannten Wachstumsfaktoren (BRADSHAW und PRENTIS, 1987). Dabei handelt es sich um eine Vielzahl von Peptiden und Proteinen, die von sehr vielen verschiedenen Zelltypen gebildet werden können. Diese Botenstoffe - auch als Growth Factors (GF) bezeichnet - entfalten ihre Wirkung überwiegend lokal, d.h. die produzierende Zelle selbst (autokrin) oder die unmittelbar benachbarten Zellen (juxta-, parakrin) werden durch die Wachstumsfaktoren beeinflusst.

Wachstumsfaktoren binden an spezifische Rezeptoren auf den Oberflächen bzw. im Zytosol ihrer jeweiligen Zielzellen und bewirken dort die Aktivierung der intrazellulären Signalübermittlung. Am Ende dieser Reaktionskette steht meistens die Änderung der genetischen Aktivität der Zelle und eine Zellteilung (Übersichten bei BRADSHAW und PRENTIS, 1987; MEYER, 1994; GIUDICE und SALEH, 1995). Als eine weitere Aufgabe der Wachstumsfaktoren wird die Induktion eines termingerechten und programmierten Zelltodes (Apoptose) angesehen (MOULTON, 1994; YUI et al., 1996). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß einige Wachstumsfaktoren die Steroidbiosynthese beeinflussen können (LUCIANO et al., 1994); andere Faktoren können an der Vermittlung der Wirkung von Steroidhormonen beteiligt sein (MUKKU und STANCEL, 1985; KLEINSTEIN et al., 1993). Hiermit wird offensichtlich, daß bei der Regulation des Wachstums und der Differenzierung keine strenge Aufgabenteilung zwischen verschiedenen Mediatorsystemen vorliegt. Vielmehr handelt es sich um sehr komplexe Interaktionen zwischen den verschiedenen Systemen.

Nur wenige Arbeiten befassen sich mit dem Vorkommen und der Bedeutung von Wachstumsfaktoren in der Plazenta des Rindes. REYNOLDS et al. (1987) wiesen im bovinen Karunkelgewebe einen Faktor nach, der in der Chorionallantoismembran von Hühnereiern angiogenetisch wirkt. Dieser Faktor wurde nur insoweit charakterisiert, als er hitzestabil war und bei der Ultrazentrifugation durch Membranen mit einer Ausschlußgrenze von 100 kDa retiniert wurde. SHEMESH et al. (1994) untersuchten den Einfluß des Epidermal Growth Factors (EGF) auf die Umwandlung von 25-Hydroxycholesterin in Progesteron durch Kulturen von

Kotyledonenzellen. Die Lokalisation, Expression, Sekretion und die Effekte von TGF- β in Rinderplazentomen wurden von MUNSON et al. (1996) untersucht.

Zur weiteren Charakterisierung der Bedeutung von Wachstumsfaktoren war es Ziel vorliegender Untersuchungen, die Expression definierter Wachstumsfaktoren, ihrer Rezeptoren und deren Verteilung im Plazentomgewebe des Rindes zu verschiedenen Trächtigkeitsstadien und unter der Geburt darzustellen.

Die Auswahl der in die Untersuchungen eingeschlossenen Wachstumsfaktoren/-rezeptoren orientierte sich vor allem an deren postulierten Bedeutung für die Plazenta und an der Verfügbarkeit der entsprechenden Nachweissysteme. So sollen mittels immunhistologischer Verfahren die Wachstumsfaktoren **acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF)**, **basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)** und **Transforming Growth Factor α (TGF- α)** sowie deren Rezeptoren **Fibroblast Growth Factor-Receptor (FGF-R)** und **Epidermal Growth Factor-Receptor (EGF-R)** nachgewiesen werden. Für aFGF und bFGF ist deren Bedeutung für die Angiogenese (BAIRD und BÖHLEN, 1990) sowie die Differenzierung und Proliferation von mesodermalen und neuroektodermalen Zellen (GOSPODAROWICZ et al., 1986 b) bekannt. Auch TGF- α , welcher seine Wirkung über die Bindung an den EGF-R vermittelt, ist als Regulator des Wachstums und der embryonalen Entwicklung bekannt und fördert die Proliferation von Epithelien (WEIMANN und KIESS, 1995) und die Angiogenese (KUMAR et al., 1995). Zusätzlich konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, daß einige Wachstumsfaktoren die Steroidbiosynthese und die Vermittlung der Wirkungen von Steroidhormonen beeinflussen: So konnten LUCIANO et al. (1994) nachweisen, daß EGF die Progesteronsynthese in Rattengranulosazellen stimuliert; auch SHEMESH et al. (1994) wiesen an bovinen Plazentazellen eine Stimulation der Progesteronsynthese durch EGF nach. Estradiol-17 β induziert die Expression von EGF-R im Uterus der Ratte (MUKKU und STANCEL, 1985) und im Endometrium vom Kaninchen (KLEINSTEIN et al.; 1993).

Da die Plazenta in ihrer Funktion als endokrine Drüse sowohl Estrogene als auch Progesteron bildet, lassen sich hier vielfältige Wechselwirkungen zwischen den Wachstumsfaktoren/-rezeptoren und den Steroidhormonen vermuten. Dies gilt auch für die Angiogenese, da LEISER et al. (1997b) – anders als BJÖRKMANN (1954) – zeigen konnten, daß die Entwicklung der Plazentome des Rindes nicht schon zum

Tag 170 der Gravidität abgeschlossen ist, sondern auch noch in späteren Trächtigkeitsstadien Wachstums- und Umbauprozesse auftreten, die auch die Bildung von Blutgefäßen einschließen.

Eine Untersuchung auf das Vorkommen von aFGF, bFGF, TGF- α und deren Rezeptoren, insbesondere ihre Lokalisation im Gewebe, erscheint daher besonders interessant. Erkenntnisse über Veränderungen der Verteilungsmuster der einzelnen Wachstumsfaktoren/-rezeptoren im Verlauf der Trächtigkeit können dazu beitragen, den Einfluß der Wachstumsfaktoren auf Differenzierungs- und Wachstumsprozesse in der Plazenta genauer zu charakterisieren.

2 Literaturübersicht

2.1 Plazentamorphologie

Die Plazenta setzt sich aus fetalen und maternalen Gewebeanteilen zusammen. Der fetale Anteil wird als „Pars fetalis“ bezeichnet und aus dem Chorion des Keimes gebildet. Das Chorion selbst ist eine epitheliale Schicht, die sich aus der äußersten Hülle der Blastozyste, dem Trophoblasten, und dem ihm innen anliegenden embryonalem Mesenchym entwickelt. (LEISER und KAUFMANN, 1994). Der maternale Anteil wird als „Pars uterina“ bezeichnet und geht aus dem Endometrium des Uterus hervor (BJÖRKMAN, 1954). Die Typisierung der Plazenta erfolgt in aller Regel nach morphologischen und histologischen Merkmalen wie z. B. Art und Ursprung der beteiligten Eihäute (Chorioplazenta, Amnioplazenta, Omphaloplazenta, Allantoplazenta) oder der äußeren Form der Plazenta (Placenta diffusa completa/incompleta, Placenta cotyledonaria, Placenta zonaria, Placenta discoidalis). Die sicherlich bekannteste Klassifikation ist die Einteilung nach GROSSER (1927), welche Typ und Anzahl der Gewebeschichten der Interhämalschranke beschreibt: Placenta epitheliochorialis, Placenta endotheliochorialis, Placenta haemochorialis (Übersicht bei SCHNORR, 1989).

2.1.1 Rinderplazenta

In der Einteilung nach STRAHL (1906) wird die Plazenta des Rindes als sog. „Placenta cotyledonaria sive multiplex“ bezeichnet (Übersicht bei SCHNORR, 1989). Nach Einwanderung der Blastozyste in den Uterus erstreckt sich der embryo-maternale Kontakt zunächst über die gesamte Trophoblastenoberfläche. Ca. ab dem 18. Tag post inseminationem (p. i.) kommt es mit der weiteren Differenzierung zur allmählichen Beschränkung der embryo-maternalen Kontaktfläche auf spezifische Strukturen, den sogenannten Plazentomen. Dabei fällt auf, daß die Kontaktaufnahme der Blastozyste im embryonahen Bereich beginnt und sich mit fortschreitender Trächtigkeit zu den Spitzen der nun schlauchförmigen Blastozyste ausbreitet (LEISER, 1975). Die Plazentome bestehen aus einem maternalen Anteil, der Karunkel, und dem fetalen Anteil, der Kotyledone. Die Karunkelanlagen werden beim Rind bereits in der Fetalphase angelegt (ATKINSON et al., 1984) und sind in Reihen angeordnet. Im Uteruskörper befinden sich vier Reihen, während in der Mitte der Uterushörner jeweils drei Reihen und zur Uterushornspitze nur noch 2 Reihen von

Karunkelanlagen vorhanden sind (HAMMOND, 1927). Korrespondierend zu den Karunkelanlagen bilden sich in der frühen Trächtigkeit die fetalen Kotyledonen aus. Durch den initialen Kontakt mit dem Trophoblasten erfährt die Uterusschleimhaut, die ein regelmäßiges, hochprismatisches Oberflächenepithel mit dichtem Mikrovillisaum aufweist, tiefgreifende Veränderungen. Es bilden sich basal im Epithel unregelmäßig geformte mehrkernige Riesenzellen, die sich zur Epitheloberfläche verlagern und dort mit den Trophoblastzellen in Kontakt treten. Der einschichtige und überwiegend aus platten bis kubischen Epithelzellen bestehende Trophoblast proliferiert und bildet jetzt zunehmend Trophoblastriesenzellen aus, die sich - wie die Riesenzellen des Uterusepithels - in der Nähe der Kontaktzone befinden. Die Zellmembranen der Uterusepithelzellen und des Trophoblasten legen sich flach aneinander. Durch die Ausbildung von Mikrovilli und Zytoplasmaprotrusionen wird die Trophoblastenoberfläche stark vergrößert und der Kontakt zwischen maternalem und fetalem Gewebe breitet sich aus (LEISER, 1975). Von dieser Kontaktstelle aus wachsen nach und nach fetale Chorionzotten, die sich in die Krypten der Karunkelanlage einsenken. Komplementär zu den Zotten bilden sich maternale Karunkelsepten aus, die sich zwischen die Zotten des Trophoblasten schieben. So entsteht eine intensive Verzahnung der maternalen und fetalen Anteile des Plazentoms. Um den 80. bis 95. Tag der Trächtigkeit hat das Plazentom seine endgültige Form entwickelt (BJÖRKMAN, 1954). Es ist beim Rind pilzförmig. Die Kotyledone besteht nun aus einer zum Fetus konvex gebogenen Chorionplatte aus der die konisch geformten Chorionzotten in Richtung Karunkel wachsen. Dabei überzieht sie kappenartig die maternale Karunkeloberfläche. Die Karunkel ihrerseits besteht aus dem Karunkelstiel, auf dem die konkave Basalplatte liegt, und den sich stark verzweigenden Karunkelsepten (LEISER et al., 1997 b).

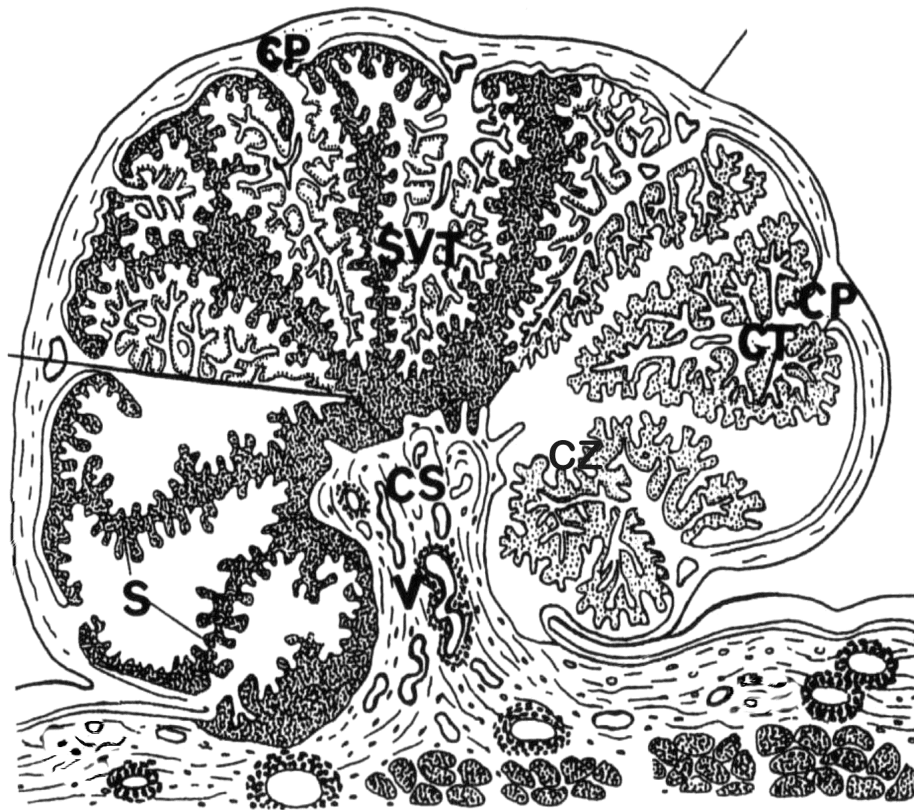


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Rinderplazentoms. Im linken Sektor sind die maternalen Septen (S) dargestellt; im rechten Sektor ist das Auswachsen der fetalen Chorionzotten (CZ) aus der Chorionplatte (CP) dargestellt. Der mittlere Sektor zeigt das Ineinandergreifen der maternalen Septen und der fetalen Chorionzotten (SVT). CT bezeichnet das fetale Bindegewebe, CS bezeichnet den Karunkelstiel und V die Blutgefäße. (Frei nach LEISER et al., 1997 a)

Betrachtet man die Gewebeschichten der Interhämalschranke, so wird die bovine Plazenta in der Einteilung nach GROSSER (1927) als epitheliochorialer Typ bezeichnet, da sich das fetale Chorion der weitestgehend intakten Uterusschleimhaut anlagert (Übersicht bei SCHNORR, 1989). Spätere Untersuchungen zeigten allerdings, daß Trophoblastriesenzellen während der gesamten Trächtigkeit in das maternale Epithel einwandern und dort mit Uterusepithelzellen fusionieren. So bilden sich trinukleäre Hybridzellen, welche nach Freisetzung spezifischer Granula aus den Trophoblastriesenzellen degenerieren. WOODING führt daher den Begriff der synepitheliochorialen Plazenta ein (WOODING und WATHES, 1980; HOFFMANN und WOODING, 1993; LEISER und KAUFMANN, 1994).

Wie bei den meisten Spezies stellt auch beim Rind das Chorionepithel als äußerste Schicht der fetoplazentaren Einheit die entscheidende Austauschbarriere zwischen

Mutter und Fetus dar. Dabei findet der histiotrophe Stoffaustausch am sogenannten glatten Chorion (Corion laeve) zwischen den Plazentomen statt, während der hämotrophe Stoffaustausch über die Blutgefäße in den Plazentomen erfolgt (SCHNORR, 1989; LEISER und KAUFMANN, 1994). Das Chorion ist über die Blutgefäße der Allantoisblase mit dem fetalen Blutkreislauf verbunden. Über ein Drittel kommt es zur Verbindung zwischen Amnion und Chorion, bezeichnet als Amnioplazenta; über etwa zwei Drittel ist das Chorion mit der Allantoisblase verbunden, was man als Allantoplazenta bezeichnet (LEISER und KAUFMANN, 1994).

Das Chorionepithel oder der Trophoblast ist beim Rind einschichtig und weist zwei morphologisch unterschiedliche Zelltypen auf, die sog. Hauptzellen und die Trophoblastriesenzellen.

Die Hauptzellen sind einkernig und werden daher auch als uninukleäre Trophoblastzellen (Uninukleäre) bezeichnet. Sie haben einen auffallenden Mikrovillisaum und eine überwiegend kubische bis hochprismatische Form. Besonders dort, wo sie an Trophoblastriesenzellen grenzen, können die Hauptzellen auch vielgestaltig verformt sein (LEISER, 1975). Aufgrund des ausgeprägten Mikrovillisaumes vermutet man bei ihnen überwiegend resorptive Aufgaben. Weiterführende Untersuchungen von GROSS und WILLIAMS (1988a), MORGAN et al. (1993) und MATAMAROS et al. (1994) zeigten jedoch, daß diese Zellen auch endokrin aktiv sind.

Der zweite Zelltyp ist groß und kann zwei- bis mehrkernig sein. Daher wird er als Trophoblastriesenzelle, Diplokaryozyt oder als **Binuclear cell (BNC)** bezeichnet. BNC stellen eine für die meisten Wiederkäuer charakteristische Trophoblastzellpopulation dar. Sie sind schon in sehr frühen Trächtigkeitsstadien nachweisbar: Beim Rind treten die ersten BNC schon am 17. Tag der Trächtigkeit, also in der späten Präimplantationsphase, auf (WIMSATT, 1951). Junge unreife BNC liegen tief im Trophoblasten; sie sind klein, zytoplasmaarm und weitgehend rund. Mit zunehmender Reifung und Entwicklung werden die BNC zu großen, runden, zytoplasmareichen und mehrkernigen Zellen, die im Zytoplasma zahlreiche Granula enthalten und eine strukturelle und dynamische Polarität aufweisen. BNC sind zur Migration fähig: Während ihrer Differenzierung wandern sie aus den tiefen Schichten des Trophoblasten an die Oberfläche. Sie dringen in das maternale Uterusepithel

ein, überwinden aber nicht die Basalmembran. Hinter der Wanderbewegung vermutet man die gezielte Sekretion endokrin aktiver Substanzen in das maternale Kompartiment (WOODING und WATHES, 1980; WOODING, 1992). Ca. 20% der fetalen Zellen sind BNC. Ihr Verteilungsmuster zeigt beim Rind über den gesamten Verlauf der Trächtigkeit kaum Veränderungen. Erst unter der Geburt kann ein Vitalitätsverlust der Diplokaryozyten beobachtet werden, welcher für den termingerechten Abgang der Nachgeburt von Bedeutung sein soll (WILLIAMS et al., 1987; GROSS et al., 1991).

Der Ursprung dieses Zelltyps ist auch heute noch weitgehend ungeklärt. Dennoch gilt es heute als gesichert, daß BNC durch azytokinetische Mitosen einkerniger Zellen entstehen (WIMSATT, 1951; WOODING, 1992; WOODING und FLINT, 1994). Dabei sieht WIMSATT (1951) einkernige Riesenzellen, welche durch direkte Transformation aus hochprismatischen Trophoblastzellen entstehen, als Ursprung der BNC, während WOODING und FLINT (1994) die asymmetrische Mitose von uninukleären Trophoblastzellen zugrunde legen. Neuere Untersuchungen von KLISCH et al. (1999a, b) beschreiben das Auftreten von tripolaren Mitosefiguren mit Bildung tri- bzw. multinukleärer Zellen und die beachtliche Genommultiplikation bis zu einem DNA-Gehalt von 16C in den Zellkernen der BNC. Sie vermuten daher, daß die von WIMSATT schon 1951 beschriebenen uninukleären Trophoblastriesenzellen keineswegs nur Entwicklungsstadien während der Differenzierung zu BNC darstellen, sondern als Endstadien der Zelldifferenzierung zu Trophoblastriesenzellen zu interpretieren sind. Aufgrund dieser Ergebnisse führen KLISCH et al. 1999 den Begriff trophoblast giant cells (TGC) ein. Da die Mehrzahl der in der Rinderplazenta auftretenden TGC dennoch binukleär und nur wenige Zellen uni- bzw. multinukleär sind (KLISCH et al., 1999), wird in dieser Arbeit der Begriff BNC beibehalten.

2.2 *Wachstumsfaktoren*

Wachstumsfaktoren sind Peptide und Proteine, die nicht nur in nahezu allen Spezies der Tierwelt, sondern bei diesen auch ubiquitär im Körper auftreten können. Es handelt sich also um hoch konservierte Polypeptide (BAIRD und BÖHLEN, 1990; ZURFLUH et al., 1990), die strukturell teilweise sehr heterogen, funktionell aber oft eng miteinander verwandt sind. Sie dienen alle der inter- und intrazellulären Kommunikation und beeinflussen bzw. regulieren in den Zielzellen die Proteinbiosynthese, die Zelldifferenzierung, die Zellproliferation und die Zellteilung.

Einzelne Wachstumsfaktoren können sogar auch gezielt Apoptose auslösen (MOULTON, 1994; YUI et al., 1996). Welche Funktion im einzelnen von einem Wachstumsfaktor ausgeführt wird, hängt nicht nur vom betreffenden Wachstumsfaktor, sondern auch von der angesprochenen Zielzelle, deren Zellzyklusstand und dem jeweiligen Mikromilieu ab (BAIRD und BÖHLEN, 1990; GIUDICE und SALEH, 1995). So kann ein Wachstumsfaktor an der gleichen Zielzelle unter Umständen völlig entgegengesetzte Wirkungen zeigen (GIUDICE und SALEH, 1995).

Wachstumsfaktoren werden nicht zu den Hormonen gezählt, da sie von nahezu allen Zellen gebildet und sezerniert werden können und überwiegend lokal wirken. Man unterscheidet zwischen der auto- und intrakrinen sowie der para- und juxtakrinen Wirkungsvermittlung, wobei im auto- und intrakrinen Fall die produzierende Zelle selbst, in den anderen Fällen die unmittelbar benachbarten Zellen durch die Wachstumsfaktoren beeinflusst werden. Endokrine Mechanismen sind generell möglich (RAO et al., 1995), treten aber nur selten auf.

Durch Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche - im Fall der auto-, para- und juxtakrinen Wirkung - bzw. im Zytosol - bei intrakrinen Wirkungen - bewirken die Wachstumsfaktoren die Aktivierung dieser Rezeptoren. Im weiteren Verlauf kommt es dann - entweder direkt oder durch sogenannte „second-messenger“-Systeme noch zusätzlich verstärkt - zu kaskadenartig ablaufenden Phosphorylierungsreaktionen an verschiedenen Enzymen. Am Ende dieser Reaktionsketten steht meistens die Änderung der genetischen Aktivität der Zelle und eine Zellteilung (Übersichten bei BRADSHAW und PRENTIS, 1987; MEYER, 1994; GIUDICE und SALEH, 1995) oder die Induktion der Apoptose (MOULTON, 1994). Die meisten Wachstumsfaktoren erreichen ihre Signalübertragung durch die Aktivierung der Tyrosinkinase; aber auch Serin- und Threoninkinase und Phospholipase-C-abhängige Signalwege werden benutzt (GOSPODAROWICZ et al., 1986 b; GIUDICE und SALEH, 1995).

2.2.1 Fibroblast Growth Factor (FGF)

Obwohl man schon Ende der dreißiger Jahre die Wirkung von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) in Gewebeextrakten gekannt und beschrieben hatte (TROWELL et al., 1939; HOFFMANN, 1940), sind erst Mitte der siebziger Jahre

weitere Untersuchungen an diesen Wirkstoffen durchgeführt worden. Zunächst war lediglich bekannt, daß in Gehirn und Hypophyse Substanzen vorkommen, die das Wachstum von Fibroblasten fördern. Anfang der siebziger Jahre reinigten dann verschiedene Arbeitsgruppen aus Hypophysen- und Gehirnextrakten ein Mitogen, welches das Wachstum von Fibroblasten und Chondrozyten in vitro stimulierte (BAIRD und BÖHLEN, 1990, WEIMANN und KIESS, 1995). Aufgrund der Wirkung und Herkunft dieses Mitogens führte man die Bezeichnung als Hypophysen- bzw. Gehirn-Fibroblastenwachstumsfaktor – kurz FGF - ein. Durch weitere Forschung wurde in den Folgejahren rasch klar, daß man mit dem Gehirn-Fibroblastenwachstumsfaktor nicht nur eine Substanz, sondern eine große Polypeptid-Familie entdeckt hatte. Bisher wurden 14 verschiedene Mitglieder dieser Familie beschrieben (GOLDFARB, 1996; COULIER et al., 1997).

Nachdem die gezielte Forschung über Wachstumsfaktoren begonnen hatte, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen zunächst immer wieder neue Proteine „entdeckt“, welche dann ebenfalls nach ihrer Herkunft und Funktion oder aufgrund bestimmter chemischer Eigenschaften benannt wurden (BRADSHAW und CAVANAUGH, 1990). Da der isoelektrische Punkt des als erstes entdeckten FGF im basischen pH-Bereich liegt, wählte man hier den Namen **basic fibroblast growth factor (bFGF)**. Der als zweiter entdeckte FGF wurde wegen seines sauren isoelektrischen Punktes folglich als **acidic fibroblast growth factor (aFGF)** bezeichnet (BAIRD und BÖHLEN, 1990).

So ergab sich im Laufe der Jahre in der internationalen Literatur eine große Vielfalt an Bezeichnungen für ein und dasselbe Protein. Erst in den letzten Jahren ist man dazu übergegangen, die einzelnen FGF mehr oder weniger in der chronologischen Reihenfolge ihrer Entdeckung durchnummerieren. So spricht man heute bei der FGF-Polypeptid-Familie überwiegend von FGF1-14. Lediglich bei den ersten, gelegentlich auch als Prototypen bezeichneten, FGF ist der alte Name nach wie vor gebräuchlich.

Alle Mitglieder der FGF-Polypeptid-Familie wirken vorwiegend auf mesodermal und neuroektodermal abstammende, sowie auf mesenchymale Zellen und Gewebe. Eine besondere Bedeutung haben die FGF in der Embryonal- und der Fetalphase. Sie sind ebenso notwendig für das Wachstum des Keimes vor der Gastrulation, wie für die Induktion der Gastrulation, der axialen Organisation und der Neurulation des Keimes. Außerdem sind sie auch maßgeblich an der Organogenese beteiligt

(GOLDFARB, 1996). Im adulten Organismus fördern FGF vor allen Dingen die Angiogenese, die Wundheilung und die Organisation der Keratinozyten. Je nach Zell- oder Gewebetyp und dem jeweiligen Entwicklungszustand des Gewebes können FGF die Zellproliferation (Zunahme der Zellanzahl), das Zellwachstum (Größenwachstum der einzelnen Zelle) und die Zelldifferenzierung fördern oder blockieren und ausdifferenzierte Zellen vor dem programmierten Zelltod (Apoptose) schützen. Aufgrund letzterer Eigenschaft und, weil einige FGF die Lebensdauer von Zellen in Zellkulturen deutlich erhöhen können, werden sie auch als „survival-factors“ von Zellen bezeichnet (RENAUD et al.; 1994).

Auffallend ist das sehr differenzierte räumliche und zeitliche Verteilungsmuster der verschiedenen Mitglieder der FGF-Polypeptid-Familie. Die meisten FGF treten in der Embryonal-/Fetalphase auf, zeigen aber stark eingeschränkte Expressionsmuster in adulten Organismen; sie sind teilweise sogar nur bei Entgleisung der genetischen Aktivität nachweisbar (BASILICO und MOSCATELLI, 1992). Die Faktoren aFGF und bFGF werden schon von der frühen Embryogenese an exprimiert und sind auch im adulten Organismus regulär nachweisbar (GOLDFARB, 1990).

Die einzelnen Mitglieder der FGF-Polypeptid-Familie unterscheiden sich deutlich in der Aminosäuresequenz und der Länge ihrer Polypeptidketten, welche zwischen 154 und 268 Aminosäuren pro Protein variiert. Dennoch weisen alle Mitglieder dieser Familie einen aus 120 Aminosäuren bestehenden Sequenzabschnitt auf, der aufgrund der erkennbaren Homologie als „Core“ bezeichnet wird. Der Grad der Homologie innerhalb dieses Core variiert zwischen 33 bis 69% zwischen den verschiedenen Mitgliedern der FGF-Polypeptid-Familie (GOLDFARB, 1990). COULIER et al. (1997) haben die Sequenzen von 40 verschiedenen FGF aus elf Säugetieren, vier Vögeln, einem Fisch und einer Nematode verglichen und festgestellt, daß 10% - also 12 Positionen – des Core in allen untersuchten FGF auftreten. Die restlichen 90% des Core variieren zwischen den verschiedenen FGF unterschiedlich stark, wobei neben Regionen mit sehr hoch konservierten Positionen (79 – 89) auch weniger konservierte Positionen (97 – 114, 138 - 146) zu finden sind.

Im Hinblick auf die einzelnen Faktoren ergeben sich jedoch wesentlich geringere Variationen der Aminosäuresequenz zwischen den verschiedenen Spezies. Hier wurden die Proteine in der Evolution offensichtlich hoch konserviert, denn ein Sequenzvergleich des Core der einzelnen Faktoren zeigt bei den Säugetieren eine

Sequenzhomologie von mehr als 92%. Auch die übrigen Abschnitte der Proteine zeigen ein hohes Maß an Homologie (COULIER et al., 1997). Bemerkenswert ist die hohe Homologie von Säugetier- und Frosch-bFGF, welche immerhin bei 84% liegt (GOLDFARB, 1990). Dieses Muster der Sequenzhomologien läßt vermuten, daß die einzelnen FGF in vivo keineswegs austauschbar sind, sondern daß sie vielmehr auseinander hervorgegangen sind und nun unterschiedliche Spektren an biologischen Funktionen aufweisen.

Ein weiteres Charakteristikum, welches die FGF von den anderen Wachstumsfaktor-Familien unterscheidet, ist ihre relativ hohe Affinität zu Heparin. Durch die Zugabe von Heparin, hochsulfatierten Glykosaminoglykanen (GAG) oder zellulären Heparansulfaten/Heparansulfatproteoglykanen (HSPG) können FGF vor der Inaktivierung durch Enzyme, hohe Temperaturen oder niedrige pH-Werte geschützt werden (GOSPODAROWICZ und CHENG, 1986). Diese Wechselwirkungen mit Heparin bedingen zwei wichtige Eigenschaften der FGF: Zum einen können FGF durch Bindung an die zellulären Heparansulfate auf Zelloberflächen lokalisiert und damit direkt verfügbar für ihre Zielzellen sein; zum anderen bietet die Bindung an Heparin Schutz vor proteolytischem Abbau, welcher für Gewebeumbau, Neovaskularisation oder Metastasierung charakteristisch ist. Dadurch können FGF auch in Geweben wirksam werden, die aufgrund ihrer metabolischen Situation für andere Substanzen eher ungünstig sind (BAIRD und BÖHLEN, 1990). LOGAN und HILL (1992) vermuten hinter der Bindung von Wachstumsfaktoren an bestimmte Moleküle der Extrazellulärmatrix (ECM) den Schlüssel zur Regulation der biologischen Aktivität von Wachstumsfaktoren. Durch die Bindung an die ECM liegen Wachstumsfaktoren in direkter Nachbarschaft zu ihren Zielzellen in biologisch inerten Formen vor. Zur Entfaltung ihrer biologischen Wirkung müssen sie aus ihrer Bindung herausgelöst werden, um anschließend an ihre hochaffinen Rezeptoren binden zu können.

Die Prototypen der FGF – aFGF und bFGF – zeigen untereinander besonders viele Ähnlichkeiten; beide besitzen keine Signalsequenz für die Sekretion, obwohl sie eindeutig zu den sekretorischen Proteinen zählen. Die Aminosäuresequenzen von aFGF und bFGF weisen eine absolute Homologie von 53% auf (ESCH et al., 1985 b). In den verbleibenden Aminosäuren unterscheiden sich 64% nur durch eine Punktmutation voneinander (GOSPODAROWICZ et al., 1986 b). Ein Vergleich der

Gene von aFGF und bFGF zeigt, daß diese Gene höhere Homologien aufweisen, als die aus ihnen hervorgehenden Genprodukte (BAIRD UND BÖHLEN, 1990). Aufgrund dieser Beobachtung vermutet man, daß sich aFGF und bFGF ursprünglich durch Genduplikation und –multiplikation aus einem Gen entwickelt haben.

Die meisten Untersuchungen zur Wirkung von aFGF und bFGF wurden an „in vitro-Systemen“ erforscht. Dabei muß beachtet werden, daß experimentell gezeigte biologische Aktivitäten nicht zwangsläufig die natürliche „in vivo“-Funktion des Faktors widerspiegeln (GOLDFARB, 1990). Die Angaben zur Wirksamkeit und zur Wirkungsrichtung von aFGF und bFGF sind in der Literatur teilweise widersprüchlich: Während GOSPODAROWICZ et al. (1986 a/b) berichten, daß aFGF und bFGF zwar die gleiche Wirkung haben, aber aFGF abhängig vom Zelltyp 30- bis 100-mal schwächer ist als bFGF, zeigen neuere Untersuchungen von ASHTON et al. (1995), daß die mitogenen Effekte von aFGF und bFGF an kultivierten Endothelzellen aus Umbilikalvenen des Menschen keine signifikanten Unterschiede aufweisen. LASLETT et al. (1997) zeigten bei Untersuchungen an fetalen und adulten Leydigzellen, daß die beiden Prototypen der FGF abhängig vom Entwicklungs- und Differenzierungsstatus der Leydigzellen unterschiedliche Wirkungen an denselben Zellen zeigen können. Das spricht dafür, daß aFGF und bFGF trotz ihrer nahen strukturellen Verwandtschaft durchaus unterschiedliche und differenzierte Aufgaben in der Steuerung von Wachstums- und Differenzierungsprozessen haben.

2.2.1.1 acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF)

aFGF – in der jüngeren Literatur auch als FGF-1 bezeichnet – ist einer der ersten beschriebenen FGF. Boviner und humaner aFGF wurde zunächst aus dem Gehirn isoliert und mit Hilfe der SDS-Gel-Elektrophorese rein dargestellt. Damit war es möglich, die komplette Primärstruktur von aFGF mit Hilfe der klassischen Proteinsequenzanalyse aufzuklären.

aFGF ist ein einkettiges Protein, das beim Rind in zwei Formen auftritt. Die größere Form besteht aus 140 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 16 kDa auf. Der kleineren Form fehlt am Aminoterminus ein Hexapeptid, dementsprechend ist sie aus 134 Aminosäuren aufgebaut und hat ein Molekulargewicht von 15,5 kDa (ESCH et al., 1985 a/ b; GIMENEZ-GALLEGO et al., 1985; GAUTSCHI-SOVA et al., 1987). Das humane aFGF, welches aus 140 Aminosäuren besteht, unterscheidet sich nur in

11 Positionen vom bovinen aFGF (GAUTSCHI-SOVA et al., 1986). aFGF besitzt zwei Bindungsstellen für Heparin, wobei eine dieser Bindungsstellen am Aminoterminus (Position 9 – 12) und die zweite Bindungsstelle am Carboxyterminus in der Position 100 – 102 lokalisiert ist (GOSPODAROWICZ et al., 1986 b). Zusätzlich läßt sich für aFGF in der Nähe des Aminoterminus (Position 21 – 27) eine sogenannte „Kerntranslokationssequenz“ darstellen (LIN et al., 1996).

Das für aFGF codierende Gen liegt im menschlichen Genom auf Chromosom 5, für das Rind ist der Genlocus bisher nicht bekannt. Bei Mensch und Maus war man in der Lage, das Gen für aFGF zu isolieren und zu charakterisieren; aFGF wird durch ein „single-copy“-Gen codiert, welches in drei proteincodierende Exons unterteilt ist. Die Exons werden durch ein 11,4 kb und ein 4,9 kb großes Intron voneinander getrennt (MADIAI et al., 1996). Die transkribierte mRNA ist 4,8 kb groß und wird zunächst in ein aus 155 Aminosäuren bestehendes Vorläufer-Protein, „precursor protein“, übersetzt (GOSPODAROWICZ et al., 1986 b), welches durch posttranslationale Modifikation in die zwei Endprodukte überführt wird.

Die intrazelluläre Verteilung von aFGF hängt vom Zellzyklus ab. Exogen zugefügtes aFGF wird von FGF-sensitiven Zellen stetig – d.h. in jeder Phase des Zellzyklus – durch Endozytose in das Zytosol aufgenommen und frei im Zytosol gelagert. Während der G1-Phase des Zellzyklus wird das aufgenommene aFGF aus dem Zytosol in den Zellkern transportiert und befindet sich dort frei in der Kernmatrix, liegt aber bevorzugt in der Nähe der Kernmembran und des Nukleolus. Direkt vor Eintritt in die S-Phase ist aFGF in der peri- und juxtanukleären Region nachweisbar (IMAMURA, et al., 1994). Bemerkenswert ist, daß die „Kerntranslokationssequenz“ keineswegs ausschlaggebend für die Translokation von aFGF in den Zellkern ist. Endogen exprimiertes aFGF, welches die „Kerntranslokationssequenz“ enthält, wird nicht in den Zellkern transportiert, während 10% eines exogen zugefügten aFGF in den Zellkern transportiert wurden (ZHAN et al., 1992). Untersuchungen von LIN et al. (1996) weisen darauf hin, daß die „Kerntranslokationssequenz“ für die Vermittlung der mitogenen Effekte von exogen aufgenommenem aFGF wichtig ist, da aFGF-Mutanten mit Deletionen in der Kerntranslokationssequenz nicht mutagen sind. Die maximale Stimulation der DNA-Synthese durch aFGF erfordert dessen Vorhandensein während der gesamten G1-Phase des Zellzyklus.

Die meisten aFGF-sensitiven Zellen sind auch in der Lage, aFGF zu bilden (BAIRD und BÖHLEN, 1990). Obwohl aFGF keine klassische Sekretionssignalsequenz besitzt, ist die aFGF-induzierte Stimulation des Zellwachstums immer von extrazellulären Interaktionen mit den spezifischen und hochaffinen Rezeptoren abhängig. Es handelt sich also ausschließlich um auto- bzw. parakrine Reaktionsmechanismen, eine intrakrine Stimulation des Zellwachstums ist – unbeschadet der intrazellulären Lokalisation von aFGF - für aFGF nicht bekannt (HICKS et al., 1996). Auf welchem Weg aFGF sezerniert wird, ist bis heute weitgehend unbekannt. HICKS et al. (1996) haben Reaktionswege identifiziert, die mit oxidativem Streß für die Zelle verbunden sind und zur Freisetzung von aFGF führen.

Ursprünglich nahm man an, daß aFGF nur in Nervengewebe wie Gehirn und Retina auftritt (LOBB und FETT, 1984; BAIRD et al., 1985); in diesen Geweben konnten relativ hohe aFGF-Konzentrationen von 0,4 mg/kg Gehirn nachgewiesen werden (BAIRD und BÖHLEN, 1990). In späteren Untersuchungen wurde aFGF auch in anderen Geweben wie Niere (GAUTSCHI-SOVA et al., 1987), Myokard und Knochen (BAIRD und BÖHLEN, 1990) gefunden. Heute weiß man, daß aFGF nicht nur physiologisch in sehr vielen mesodermal und neuroektodermal abstammenden Zellen vorkommt, sondern auch in vielen verschiedenen Tumoren exprimiert wird (BAIRD und BÖHLEN, 1990).

aFGF wurde aufgrund seiner mitogenen Wirkung auf kultivierte Fibroblasten entdeckt. Heute weiß man, daß aFGF auf sehr viele Zellen – überwiegend auf Zellen mesenchymalen und neuroektodermalen Ursprungs – durch die Verkürzung der G1-Phase des Zellzyklus mitogen wirkt (GOSPODAROWICZ et al., 1980). Aber auch viele nicht-mitogene Zellfunktionen, wie die Stimulation bzw. die Suppression der zellspezifischen Proteinbiosynthese, die Sekretion zellulärer Proteine, die Chemotaxis und Zellmigration, die zelluläre Differenzierung, die Lebensdauer von Zellen in Zellkulturen und damit auch der Beginn der Zellalterung, werden durch aFGF moduliert (BAIRD und BÖHLEN, 1990). In der Embryonal- bzw. Fetalphase äußern sich die Wirkungen von aFGF unter anderem in der Induktion der embryonalen Mesodermbildung und der neuronalen Differenzierung, in adulten Organismen stehen die Regeneration, die Wundheilung und die Angiogenese im Vordergrund. Bei Nagetieren induziert auf Wunden aufgetragenes aFGF eine deutliche Stimulation der Angiogenese, die Bildung von Granulationsgewebe und das

Wachstum von neuem Epithel; dagegen wird die dermale Kontraktion – also die Annäherung der Wundränder durch Kontraktion elastischer Fasern - nicht von aFGF gesteigert (MELLIN et al., 1992).

Durch die Wirkung von aFGF werden Endothelzellen und glatte Muskelzellen zur Proliferation – erstere auch zur Zellmigration – angeregt. So ist aFGF sowohl an der Neovaskularisation von Geweben (Wachstum eines Gewebes) als auch an der Reparatur beschädigter Gewebe beteiligt (Einsprossung von Kapillaren in geschädigtes Gewebe).

2.2.1.2 basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)

bFGF wurde in den siebziger Jahren in Hirn- und Hypophysenextrakten von Rind und Mensch entdeckt (Übersicht bei WEIMANN und KIESS, 1995). In der jüngeren Literatur wird bFGF immer häufiger auch als FGF-2 bezeichnet.

Zunächst wurde bFGF als annähernd 12 kDa schweres, hitze- und säurelabiles Protein mit einem im alkalischen Bereich (bei pH-Wert 9,6) liegenden isoelektrischen Punkt beschrieben (BAIRD und BÖHLEN, 1990). Nachdem BÖHLEN et al. (1984) bFGF in Reinform dargestellt hatten, konnten die chemisch-physikalischen und strukturellen Eigenschaften des Wachstumsfaktors genauer untersucht werden:

bFGF ist ein einkettiges Protein. Es ist aus 146 Aminosäuren aufgebaut, kann aber auch in vielen anderen Größen bzw. Kettenlängen - sogenannten Isoformen – auftreten. Das mittlere Molekulargewicht liegt - je nach Isoform – zwischen 15 – 25 kDa. bFGF weist eine 55%ige Strukturhomologie zu aFGF auf. Wie aFGF besitzt auch bFGF zwei Bindungsstellen für Heparin, die sich in der Nähe des Aminoterminus in Position 18 – 22 und in Richtung des Carboxyterminus in Position 107 – 110 befinden. In den Abschnitten 37 – 40 und 78 – 81 befindet sich eine kurze Zellerkennungssequenz, welche eine exakte Inversion der Zellerkennungssequenz des Fibronectins ist (GOSPODAROWICZ et al., 1986 b). ESCH et al. (1985 a) vermuten, daß bFGF mit diesen Proteinabschnitten an Zelloberflächen binden kann. Die großen bFGF-Isoformen enthalten wie aFGF „Kerntranslokationssequenzen“. Die Funktion bzw. Wirkung dieser Sequenz bei bFGF wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert: PRESTA et al. (1993) berichten, daß die Kerntranslokationssequenz in Position 27 – 31 weder als Translokations- noch als Retentionssequenz für bFGF wirkt, sondern nur die Bildung eines

urokinaseabhängigen Plasminogenaktivators steigert. Dennoch beschreiben AMALRIC et al. (1994), daß die höhermolekularen Isoformen von bFGF eine funktionelle Kerntranslokationssequenz aufweisen, welche die Akkumulation dieser Isoformen im Zellkern ermöglichen.

Das Gen für bFGF befindet sich beim Menschen auf Chromosom 4, für das Rind ist bisher kein Genlocus bekannt. Wie bei aFGF handelt es sich auch hier um ein „single-copy“-Gen, das in drei proteincodierende Exons unterteilt ist. Die genomische DNA von bFGF umfaßt bis zu 38 kb und wird in 7-, 3,7- und 1,4 kb große mRNA transkribiert (BAIRD und BÖHLEN, 1990). Diese kodieren beim Menschen alle vier coexprimierten Isoformen, welche Molekulargewichte von annähernd 24 kDa, 22,5 kDa, 22 kDa und 18 kDa aufweisen und alle von einer einzigen mRNA translatiert werden können (GUALANDRIS et al., 1994; FLORKIEWICZ et al., 1995). Beim Rind sind bFGF-Isoformen mit Molekulargewichten von 16 kDa, 18 kDa, 24 kDa und 26 kDa bekannt (YU et al., 1993; SCHAMS et al., 1994). Die von der DNA transkribierte mRNA des bFGF-Gens enthält neben dem klassischen Startcodon (Basentriplett AUG) auch noch mehrere zusätzliche Initiationcodons (Basentriplett CUG), an denen die Translation der mRNA beginnen kann. Durch alternierenden Beginn der Translation an diesen verschiedenen Initiationcodons können von einem mRNA-Strang die unterschiedlichen bFGF-Isoformen gebildet werden (PASUMARTHI et al., 1996). Da die CUG-Codons strangaufwärts vom AUG-Codon auf der mRNA liegen (siehe Abbildung 2: Schematische Darstellung der mRNA von humanem bFGF), ist in den höhermolekularen bFGF-Isoformen die vollständige Sequenz der niedermolekularen 18 kDa schweren Isoform enthalten (RIFKIN et al., 1994). Die biologische Aktivität der verschiedenen Isoformen von bFGF wie mitogene Wirkung, Stimulation der ribosomalen RNA (rRNA) oder Abbauwege des bFGF ist – wie Untersuchungen an adulten Aorta-Endothelzellen des Rindes zeigten – weitestgehend gleich. Die Stimulation des Plasminogenaktivators wird jedoch nur durch die hochmolekulare, aus 210 AS bestehende, Isoform verstärkt. Dieses Phänomen korreliert mit der Kernakkumulation des Faktors (PATRY et al., 1994).

Struktur der humanen bFGF-mRNA :

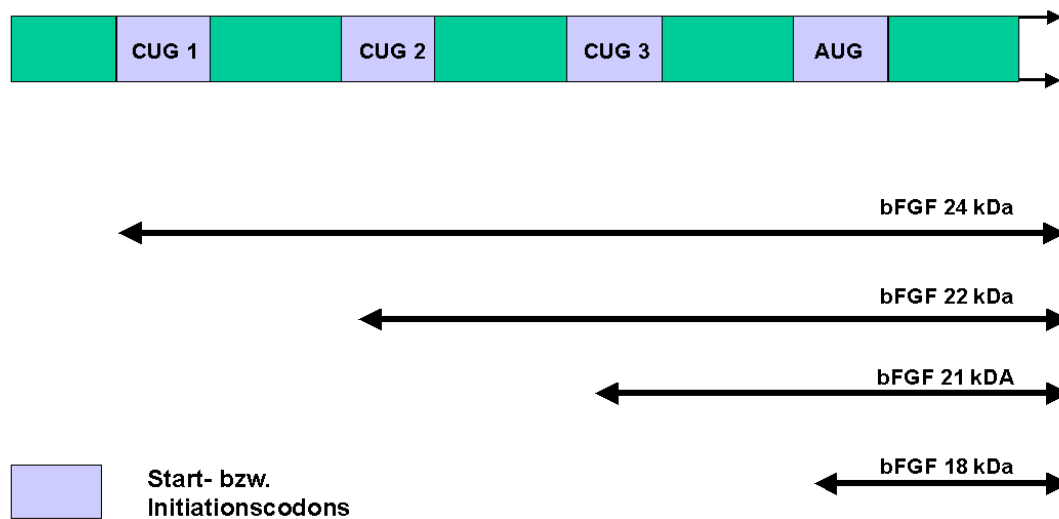


Abbildung 2: Schematische Darstellung der mRNA von humanem bFGF

Die intrazelluläre Verteilung von bFGF hängt von verschiedenen Parametern ab. Zum einen werden endogen gebildetes und exogen zugefügtes bFGF innerhalb einer Zelle unterschiedlich behandelt (GUALANDRIS et al., 1994); zum anderen sind die Transportwege und die Lokalisation des bFGF in den Zellen vom vorherrschenden Mikromilieu, dem jeweiligen Zellzyklusstand und Entwicklungsgrad der Zelle (YU et al., 1993) und von der jeweiligen bFGF Isoform abhängig. Dementsprechend sind die Beschreibungen in der Literatur teilweise kontrovers. Sicher ist, daß die Aufnahme von exogen zugefügtem bFGF in das Zytosol wie bei aFGF kontinuierlich in allen Phasen des Zellzyklus erfolgt, wobei ein Maximum der Aufnahme in der G2-Phase auftritt. Die nukleäre Translokation erfolgt ausschließlich in der späten G1-Phase (BALDIN et al., 1990). Mechanismus, zeitlicher Verlauf und bevorzugte Isoformen der nukleären Translokation sind bis heute umstritten. HAWKER und GRANGER (1992) berichten, daß bFGF nach Bindung an seinen membranständigen Rezeptor direkt internalisiert wird und schon innerhalb der ersten 2 Stunden 50% des aufgenommenen Faktors im Kern nachweisbar seien. Im Kern werden vorwiegend die hochmolekularen Isoformen gefunden, welche auch nach 24 Stunden unverändert vorliegen, während im Zytoplasma gelagertes bFGF schon innerhalb kurzer Zeit in kleinere Fragmente gespalten wird. Abweichend davon beschreiben GUALANDRIS et al. (1994), daß die 24 kDa Form von bFGF direkt nach der

Aufnahme in das Zytosol in kleinere Fragmente gespalten wird und nur sehr geringe Mengen des exogen zugefügten bFGF in der hochmolekularen Form nukleär gebunden werden. AMALRIC et al. (1994) konnten an Ovarzellen des Hamsters zeigen, daß für den Transport von exogen aufgenommenem bFGF in den Kern Heparansulfatproteoglykane (HSPG) benötigt werden. Sie vermuten, daß bFGF mit HSPG im Kotransport in den Zellkern gelangt.

Bei endogen gebildetem bFGF hängt die Lokalisation in der Zelle hauptsächlich von der Größe der Isoform ab. Die niedermolekularen – am AUG-Codon initiierten - Isoformen werden vorwiegend im Zytoplasma gelagert oder exportiert und auf der Zelloberfläche gebunden, nicht aber in das umgebende Medium abgegeben. Die an den CUG-Codons initiierten größeren Isoformen sind nukleär nachweisbar (BUGLER et al., 1991; FLORKIEWICZ et al., 1991). BUGLER et al. (1991) vermuten daher, daß die alternierende Benutzung der verschiedenen Startcodons die zelluläre Verteilung des Faktors reguliert und so dessen Rolle in der Kontrolle der zellulären Differenzierungs- und Wachstumsprozesse moduliert. DELL'ERA et al. (1991) vermuten, daß endogen produziertes bFGF zunächst intrazellulär sortiert wird und dann - je nach Zustand der Zelle - in den Zellkern transportiert wird.

Obwohl der Mechanismus der Sekretion von bFGF bis heute vollkommen unklar ist, ist es unumstritten, daß bFGF sezerniert wird. Durch viele Untersuchungen konnte zweifelsfrei gezeigt werden, daß bFGF parakrine/autokrine Wirkungsmechanismen aufweist und in der ECM von vielen Geweben und Basalmembranen gelagert wird (GOSPODAROWICZ et al., 1984; GLOBUS et al., 1989; PASUMARTHI et al., 1996; HAMAI et al., 1998). FLORKIEWICZ et al. (1995) ist es gelungen, an Zellkulturen einen neuen membran-assoziierten Transportweg zu identifizieren. Dieser Mechanismus ist spezifisch für die 18 kDa Isoform von bFGF; er benötigt Energie und ist unabhängig von klassischen Transportsystemen der Zelle wie Golgi-Apparat und endoplasmatisches Retikulum.

Neben den autokrinen und parakrinen Wirkungsmechanismen konnten für bFGF auch intrakrine Signalwege identifiziert werden (DELL'ERA et al., 1991; PASUMARTHI et al., 1996; DAVIS et al., 1997).

Bezogen auf die Gewichtseinheit konnten die größten Mengen von bFGF – nahezu 0,5 mg/kg – aus Hypophysenextrakten isoliert werden (BAIRD und BÖHLEN, 1990).

In allen anderen Geweben ist bFGF in wesentlich geringeren Konzentrationen enthalten. Im Vergleich zu aFGF ist die Verteilung von bFGF auf die einzelnen Gewebe wesentlich größer. bFGF wurde in den meisten mesodermalen und neuroektodermalen Geweben nachgewiesen: Gehirn, Hypophyse, Retina, Corpus luteum, Nebenniere, Niere, Plazenta, Prostata, Thymus, Gefäßmuskelzellen, Gefäßendothelzellen und Makrophagen (GOSPODAROWICZ et al., 1986 b). Beim Wachstum in Zellkulturen wird bFGF von sehr vielen verschiedenen normalen Zellen und Tumorzellen gebildet (BAIRD und BÖHLEN, 1990).

Die starke mitogene Wirkung von bFGF auf mesodermal abstammende Zellen wurde unter anderem an folgenden Geweben beobachtet: Gefäßendothelien großer Gefäße und Kapillaren, Endothelzellen der Kornea, Gefäßmuskelzellen, Myoblasten, Granulosazellen des Rindes, Nebennierenrindenzellen. Die meisten Zellen reagieren auf die Zugabe von bFGF mit einer für Wachstumsfaktoren typischen Steigerung der DNA-Synthese und Zellteilungsrate. Wie bei aFGF wird auch bei bFGF dieser Effekt durch die Verkürzung der G1-Phase des Zellzyklus erreicht (GOSPODAROWICZ et al., 1980; BAIRD und BÖHLEN, 1990). Aber auch eine Vielzahl von nicht mitogenen Reaktionen auf bFGF sind bekannt und entsprechen denen von aFGF (siehe Kapitel: 2.2.1.1, Seite 16). bFGF ist ein wichtiger und potenter Angiogenesefaktor. Unter dem Einfluß von bFGF werden in vitro und in vivo die Migration von Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen stimuliert (GOSPODAROWICZ et al., 1986 b; BAIRD und BÖHLEN, 1990) und bei künstlich erzeugter Ischämie die Ausbildung von Kollateralgefäßen und die Neovaskularisation der ischämischen Gewebe beschleunigt (BAFFOUR et al., 1992). Bei der Wundheilung steigert die Zugabe von bFGF die Bildung von Granulationsgewebe (BUNTROCK et al., 1982). Außerdem beeinflusst bFGF die Morphologie und das Wachstumsmuster von kultivierten Zellen. Bei Zugabe von bFGF werden Fibroblasten, Gefäßendothelien und –muskelzellen spindelförmig. Nach Zugabe von bFGF zu ausgewachsenen Monolayern von BALB/c 3T3 Zellen bilden diese Membranauffaltungen mit Makropinozytosevesikeln aus, werden spindelförmig und wachsen nicht mehr gerichtet, sondern kreuz und quer. Diese Veränderungen sind reversibel durch den Entzug von bFGF. Weiterhin kontrolliert und moduliert bFGF die zelluläre Proteinsynthese und –sekretion, indem es die Bildung von rRNA und Polysomen induziert. Innerhalb von sechs Stunden nach bFGF-Zugabe werden mehr als 85% der gesamten zellulären mRNA kultivierter Zellen an Ribosomen gebunden. Für nicht ausdifferenzierte mesodermale und

neuroektodermale Zellen dient bFGF als Differenzierungsfaktor. Durch eine signifikante Verzögerung der Zellalterung werden ausdifferenzierte Zellen in ihrer phänotypischen Expression stabilisiert und die Lebensspannen von Zellkulturen deutlich erhöht (GOSPODAROWICZ et al., 1986 b). Auch auf das Wachstum von Tumoren kann bFGF auf unterschiedlichen Wegen Einfluß nehmen: Als parakriner Wachstumsfaktor für Gefäßendothelien kann bFGF die tumoröse Angiogeneseaktivität steigern (BAIRD und BÖHLEN, 1990). Da einige Tumore in ihren Zellen bFGF exprimieren (CATTINI et al., 1991), kann tumorabstammendes bFGF das Wachstum des Tumors, aber auf parakrinem Wege auch das Wachstum nicht tumoröser Zellen der Umgebung anregen.

Auch in der Reproduktion spielt bFGF eine bedeutende Rolle. Die physiologischerweise auftretenden tiefgreifenden morpho-histologischen Veränderungen des weiblichen Reproduktionsapparates während des Zyklus und der frühen Trächtigkeit - in Vorbereitung auf die embryonale Implantation mit nachfolgender plazentarer und fetaler Entwicklung - sind einzigartig unter den Geweben (GIUDICE und SAHLEH, 1995). Die genaue zeitliche und räumliche Koordination dieser Umbau- und Differenzierungsprozesse im Reproduktionstrakt sind Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Etablierung und Aufrechterhaltung einer Trächtigkeit. Eine zentrale Rolle spielen dabei die Wachstumsfaktoren, die nicht nur im Genitaltrakt, sondern auch in den frühembryonalen Geweben exprimiert werden. Der Einfluß von bFGF auf die Stimulation der Zellteilung und -differenzierung, sowie die Steigerung der Angiogenese in der frühen Trächtigkeit, wurde bereits bei verschiedenen Spezies (Labornagern, Mensch und Schwein) gezeigt. bFGF wird nicht nur im Bereich der Implantationsstelle des Embryos vom uterinen Gewebe gebildet (CARLONE und RIDER, 1993; WORDINGER et al., 1994; GUPTA et al., 1997), sondern auch vom Embryo selbst (GUPTA et al., 1997), in der Plazenta (SHAMS und AHMED, 1994; MÜHLHAUSER et al., 1996; DI BLASIO et al., 1997; GUPTA et al., 1997; ZHENG et al., 1997), im Ovar (GROTHER und UNSICKER, 1989; STIRLING et al., 1991; WANDJI et al., 1992; SCHAMS et al., 1994; van WEZEL et al., 1995; YAMAMOTO et al., 1997) und im bovinem Ovidukt (VIUFF et al., 1995).

Die Untersuchungen zum Vorkommen und der Funktionen von bFGF in der Plazenta sind überwiegend an der menschlichen Plazenta vorgenommen worden. Im ersten

Trimester der Schwangerschaft wird die mRNA von bFGF in den die Plazentazotten direkt umgebenden Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten exprimiert, wobei in der Nähe von kleinen Arterien eine deutliche Signalverstärkung auftritt. In geburtsreifen Stadien wird die mRNA überwiegend im Synzytiotrophoblasten der Plazentazotten und in den glatten Gefäßmuskelzellen großer und mittelgroßer Gefäße gebildet (FERRIANI et al., 1994; SHAMS und AHMED, 1994). Die Untersuchungen von MÜHLHAUSER et al. (1996) ergänzen diese Beobachtungen dahin gehend, daß in der Plazenta des Menschen bFGF zusammen mit HSPG auftritt: Im ersten Trimester können HSPG in der Basalmembran der Zotten nachgewiesen werden, in der geburtsreifen Plazenta ist das gemeinsame Auftreten von bFGF und HSPG auf fetale Gefäßwände beschränkt.

Beim Rind beschränken sich die Untersuchungen zum Vorkommen von bFGF im Reproduktionstrakt überwiegend auf das Vorkommen im Ovar: GROTHE und UNSICKER (1989) beschreiben, daß die Epithelzellen wachsender Follikel und die Granulosazellen reifer Follikel ein starkes immunhistologisches Signal für bFGF aufweisen. Die immunhistologischen Untersuchungen von SCHAMS et al. (1994) am Corpus luteum (C.l.) - zu verschiedenen Stadien der Lutealphase während des Zyklus und in der Gravidität - zeigen, daß das C.l. in den einzelnen Phasen sehr unterschiedliche Färbemuster für bFGF aufweist. In den frühen Phasen werden zunächst nur Gefäßzellen, später auch die Zellmembranen großer Lutealzellen gefärbt, während in den späten Phasen die Kapillarendothelzellen negativ sind und in den Lutealzellen ein zytoplasmatisches Signal überwiegt. SCHAMS et al. (1994) vermuten aufgrund dieser Ergebnisse, daß bFGF in den frühen Phasen mehr angiogenetische Funktionen aufweist, später aber eher luteotrope Wirkungen entfaltet. In den Follikeln und den C.l. des Rindes wird überwiegend die 7 kb große mRNA für bFGF gebildet, wobei die Menge in der späten Lutealphase steigt. Durch die Zugabe von luteotropem Hormon (LH) oder humanem Chorion-Gonadotropin (hCG) zu in Primärkultur gehaltenen Lutealzellen wird die Expression der mRNA für bFGF gesteigert, während die Behandlung mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) zur Abnahme der mRNA in diesen Zellen führt (STIRLING et al., 1991).

Auch durch viele andere Untersuchungen konnten die vielfältigen Wechselwirkungen zwischen Hormonen und Wachstumsfaktoren gezeigt werden. BAIRD und BÖHLEN (1990) berichten, daß bFGF hemmend auf die Aromataseaktivität in Granulosazellen,

Leydigzellen und Fibroblasten, die Testosteronsynthese in Hodenzellen und die FSH-abhängige LH-Rezeptor-Induktion wirkt. Die Wirkung von bFGF am Ovar wird in der Literatur teilweise kontrovers diskutiert: HURWITZ et al. (1990), VERNON und SPICER (1994) sowie SCARAMUZZI und DOWNING (1995) berichten, daß im Ovar die Produktion und Sekretion von Estradiol und Androstendion durch bFGF gehemmt wird, während die Sekretion von Progesteron nicht beeinflußt wird. Im Gegensatz dazu beschreiben LIEBERMANN et al. (1996) die bFGF-induzierte starke Stimulation der Progesteronfreisetzung aus dem bovinem C.I. während der Blütephase. Die Reduktion der Estrogen- bzw. Androgenbildung vermittelt bFGF dabei durch die Hemmung der 17- α -Hydroxylase und der hCG-stimulierten Androgenbiosynthese (HURWITZ et al., 1990). Die Arbeiten von PRESTA (1988) und CARLONE und RIDER (1993) zeigen, daß Estrogene und Progesteron ihrerseits auch die bFGF-Gehalte von Zellen modulieren können. Es handelt sich also um vielschichtige Wechselwirkungen zwischen den Hormonen und bFGF.

2.2.2 Transforming Growth Factor- α (TGF- α)

Transforming Growth Factor- α (TGF- α) ist ein Polypeptid, welches zur Familie der Epidermal Growth Factor-Peptide (EGF-Peptide) gehört und ursprünglich aus dem Kulturmedium viral transformierter Sarkomzellen von Mäusen isoliert wurde (KUMAR et al., 1995). Zunächst wurde das Peptid als Sarcoma Growth Factor (SGF) bezeichnet (DeLARCO und TODARO, 1978). Später stellte man fest, daß SGF die Mischung eines EGF-ähnlichen Faktors (TGF- α) und eines zweiten, nicht verwandten Faktors – TGF- β – darstellte (ROBERTS et al., 1981).

Von TODARO et al. (1976) wurde TGF- α gereinigt und sequenziert. Bei Mensch, Nagetieren und Rind besteht die Polypeptidkette des reifen TGF- α aus 50 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von annähernd 5,6 kDa (ZURFLUH et al., 1990; WEIMANN und KIESS, 1995). Das lösliche und mature TGF- α wird aus einem Vorläuferprotein, dem proTGF- α , freigesetzt. Beim Menschen ist proTGF- α ein membrangebundenes und aus 160 Aminosäuren aufgebautes Polypeptid, welches in drei unterschiedliche funktionelle Abschnitte – die zytoplasmatische, die transmembranale und die extrazelluläre Domäne – eingeteilt wird. Die zytoplasmatische Domäne besteht aus 38 Aminosäuren und stellt das C-terminale Ende der Polypeptidkette dar. Die transmembranale Domäne dient der Verankerung

des Moleküls in der Plasmamembran, besteht aus 23 Aminosäuren und ist hydrophob. Der Aminotermius des Proteins bildet die extrazelluläre Domäne, welche zwischen den Aminosäuren 40 bis 90 die lösliche und mature Form des Wachstumsfaktors enthält. Der reife, lösliche TGF- α wird erst nach enzymatischer Spaltung aus dem membrangebundenen Vorläufermolekül freigesetzt und kann dann im umgebenden Medium nachgewiesen werden (KUMAR et al., 1995). Wie alle Mitglieder der EGF-Polypeptidfamilie besitzt auch TGF- α die sogenannte „EGF-Domäne“. Diese Domäne liegt im Bereich des maturen Wachstumsfaktors und besteht aus 35 bis 40 Aminosäuren, in denen sechs Cysteinreste (C1 – C6) auftreten. Alle Cysteinreste sind an der Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken beteiligt, wobei die Brückenbildung stets zwischen C1 und C3, C2 und C4, sowie zwischen C5 und C6 auftritt (DAVIS, 1990). Die dabei entstehende schleifenartige Struktur scheint für die Rezeptorbindung von TGF- α wichtig zu sein (MASSAGUÉ, 1990).

Sowohl die reife Form von TGF- α als auch das Vorläuferprotein proTGF- α und die Gene dieser Proteine sind – wie für Wachstumsfaktoren typisch - in der Evolution hoch konserviert: Untersuchungen von ZURFLUH et al. (1990) zeigen, daß die Aminosäuresequenzen zwischen humanem und bovinem TGF- α eine 96%ige Homologie, zwischen Ratte und bovinem TGF- α eine 92%ige Homologie aufweisen. Auf der Nukleotidebene betragen die Homologien zwischen Mensch und Rind 95%, zwischen Ratte und Rind 87%. Die Sequenzhomologie der Aminosäuren zwischen TGF- α und EGF beträgt dagegen nur 32% (MARQUARDT et al., 1984).

Das TGF- α -Gen wird aus insgesamt sechs Exons gebildet, umfaßt 70 bis 100 kb und liegt beim Menschen auf Chromosom 2; der Genlocus für das Rind ist bisher nicht bekannt. Der reife Faktor selbst wird nur durch zwei Exons - Exon 3 und 4 - kodiert. Das gesamte TGF- α -Gen wird in eine 4,5 bis 4,8 kb große mRNA transkribiert (KUMAR et al., 1995), welche in das 20 – 22 kDa große Vorläufermolekül proTGF- α translatiert wird. Durch posttranslationale Modifikationen wird aus proTGF- α aktives TGF- α gebildet, welches in verschiedenen Größen mit Molekulargewichten von 6 bis 20 kDa existiert. Die Heterogenität dieses Moleküls beruht zum einen auf dem unterschiedlichen Typ und Grad der N- und O-Glykosilierungen des Faktors, zum anderen auf den verschiedenen Stufen der proteolytischen Reinigung während der

Reifung des proTGF- α zum fertigen Wachstumsfaktor (KUMAR et al., 1995; BASELGA et al., 1996).

Die Freisetzung von TGF- α aus dem Vorläufer proTGF- α läuft in zwei Schritten ab: Zunächst wird durch die Spaltung zwischen den Aminosäuren Alanin (Position 39) und Valin (Position 40) die aminoterminal Domäne entfernt. Diese Spaltung erfolgt außerordentlich schnell – in den meisten Zellen mit einer Halbwertszeit von ca. 15 Minuten – und ist an der Plasmamembran oder in direkter Nähe dieser lokalisiert. Dabei entsteht ein zellassoziertes 17 kDa schweres proTGF- α , welches die Sequenz des reifen TGF- α enthält. Die zweite Spaltung erfolgt wieder zwischen den Aminosäuren Alanin und Valin, diesmal in den Positionen 89 und 90, läuft aber sehr langsam ab. Sie führt zur Bildung des löslichen, reifen und 6 kDa großen Faktors TGF- α , welcher im umgebenden Medium akkumuliert (ANKLESARIA et al., 1990; KUDLOW und BJORGE, 1990; BASELGA et al., 1996). Da der zweite Spaltungsschritt sehr langsam erfolgt (TEIXIDÓ et al., 1990; PANDIELLA und MASSAGUÉ, 1991), wird nach der Entfernung der aminoterminalen Domäne TGF- α in membrangebundener Form auf der Zelloberfläche angereichert. KUMAR et al. (1995) sowie BASELGA et al. (1996) vermuten dahinter die Aufrechterhaltung hoher lokaler Konzentrationen von TGF- α . Wie die Bildung und Spaltung des proTGF- α -Moleküles gesteuert bzw. reguliert wird, ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Dennoch kann mit Sicherheit gesagt werden, daß die Aktivierung des Epidermal Growth Factor Receptors (EGF-R) sowohl zur Erhöhung der mRNA-Konzentrationen von proTGF- α als auch zur schnellen Abspaltung der aminoterminalen Domäne vom membrangebundenen proTGF- α führt. Außerdem zeigen Untersuchungen von BASELGA et al. (1996), daß „first-messenger“-Systeme genauso beteiligt sind wie „second-messenger“-Systeme. Bemerkenswert ist, daß TGF- α seine Bereitstellung aus dem Vorläufermolekül selbst regulieren kann.

TGF- α besitzt keinen eigenen spezifischen Rezeptor, sondern vermittelt seine Wirkung über die Bindung an den EGF-Rezeptor (EGF-R), wobei die Stimulation des Rezeptors auf autokrinem, parakrinem und juxtakrinem bzw. revers juxtakrinem Wege erfolgt. Der EGF-R ist ein 170 kDa großes transmembranales Protein mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität, der durch Bindung von löslichem TGF- α aus der selben (autokrin) bzw. aus benachbarten Zellen (parakrin) aktiviert wird, ebenso wie

durch die Bindung von membranständigem TGF- α der direkt benachbarten Zellen (juxtakrin). Auch in der TGF- α tragenden Zelle kann durch die Bindung des EGF-R eine bindungsabhängige Proliferation und DNA-Synthese beobachtet werden (revers juxtakrin) (KUMAR et al., 1995; BASELGA et al., 1996).

Sowohl die mRNA von TGF- α als auch das Protein selbst können in vielen verschiedenen Tumortypen, besonders in Karzinomen, Tumorzelllinien des Menschen und einer Vielzahl transformierter Zellen nachgewiesen werden. Viele der TGF- α exprimierenden Tumore weisen zusätzlich erhöhte Mengen der mRNA des EGF-R auf (DERYNCK et al., 1987). Diese Beobachtung führte dazu, daß man TGF- α eine autokrine bzw. parakrine Rolle in der Tumorgenese zuschrieb (KUMAR et al., 1995). Spätere Untersuchungen zeigten, daß TGF- α auch in verschiedenen normalen adulten Geweben wie Darm, Mukosa des Magens, Leber, Niere, Haut, Gehirn, Keratinozyten und glatten Gefäßmuskelzellen auftritt (KUDLOW und BJORGE, 1990; MUELLER und KUDLOW, 1991; DERYNCK, 1992; KUMAR et al., 1995). Auch in menschlichen Thrombozyten (CARPENTER und WAHL, 1990) sowie in aktivierten Makrophagen und eosinophilen Granulozyten (MADTES et al., 1988; WONG et al., 1990) ist TGF- α in hohen Konzentrationen enthalten. Beim Rind ist TGF- α in Gefäßendothelien vom Ovar, in der Leber, im Gehirn, in der Speiseröhre, im Uterus und in den Vasa vasorum der Aorta nachgewiesen worden (LOBB et al., 1989). Während der Entwicklung wird TGF- α vorübergehend in verschiedenen Geweben von Mäuse- und Rattenembryonen gebildet (CROTEAU et al., 1995; KUMAR et al., 1995). Beim Schwein kann die mRNA von TGF- α im Eileiter und im Endometrium von zyklischen und frühträchtigen Sauen (KENNEDY et al., 1994) sowie vom achten bis zwölften Tag der Trächtigkeit in der sich entwickelnden Blastozyste nachgewiesen werden (VAUGHAN et al., 1992). Auch beim Menschen wird TGF- α im Eileiter (ADACHI et al., 1995), während der gesamten Schwangerschaft an der fetomaternalen Grenzfläche, in den fetalen Häuten, im Trophoblasten (LYSIAK et al., 1993) und in der Nabelschnur exprimiert (RAO et al., 1995). Beim Mann konnte TGF- α sowohl in der normalen als auch in der hyperplastischen und der tumorös veränderten Prostata nachgewiesen werden (LIU et al., 1993; DeBELLIS et al., 1996). Beim Rind wurde TGF- α in den Thekazellen präantraler und früher antraler Follikel und in den Gefäßendothelzellen der Arteriolen

nachgewiesen. Die Expression von TGF- α in den Thekazellen verläuft dabei zeitgleich mit der aktiven Teilung der Granulosazellen (LOBB et al., 1989).

Zahlreiche Untersuchungen beschäftigen sich mit der Synthese, Expression und Funktion von TGF- α in der Plazenta. Beim Menschen werden über den gesamten Verlauf der Schwangerschaft relativ hohe Mengen von immunreaktivem und rezeptoraktivem TGF- α in der Plazenta exprimiert (BISSONNETTE et al., 1992). Im proliferativen Endometrium ist TGF- α überwiegend in den Stromazellen lokalisiert, während sich nach der Ovulation das Signal in das Drüsen- und Oberflächenepithel des sekretorischen Endometriums verlagert. Der Trophoblast exprimiert nur im ersten Trimester TGF- α , wobei Zytotrophoblast und Synzytiotrophoblast positiv reagieren (HOROWITZ et al., 1993). Zunächst wurden auto- und parakrine Wirkungsmechanismen für TGF- α in der Plazenta postuliert. Die Arbeit von BUSH et al. (1998) läßt allerdings juxtakrine Mechanismen als vorrangig erscheinen. Auch bei der Katze wird TGF- α während der Proliferation in uterinen Stromazellen exprimiert, mit fortschreitender Trächtigkeit verlagert sich auch hier das Signal in das Oberflächenepithel. Im Trophoblasten ist das Signal auf die Synzytien beschränkt, während der Zytotrophoblast den EGF-R exprimiert (BOOMSMA et al., 1997). Beim Schwein kann TGF- α sowohl in den ersten drei Wochen der Gravidität als auch während des Zyklus im Endometrium nachgewiesen werden (KENNEDY et al., 1994), während in den Blastozysten die mRNA von TGF- α nur zwischen dem achten und zwölften Tag nachweisbar ist (VAUGHAN et al., 1992). Bei Rind und Maus exprimieren die Embryonen mit Bildung der Zygote bis zur beginnenden Implantation TGF- α (WATSON et al., 1992).

CHRISTENSEN und POULSEN (1996) fanden heraus, daß TGF- α nicht nur sehr weit verbreitet im humanen Gewebe ist und bevorzugt in differenzierten Zellen auftritt, sondern auch in Geweben nachgewiesen werden kann, die sich aus allen drei Keimblättern ableiten lassen. In epithelialen Zellen treten im allgemeinen drei Färbemuster für TGF- α auf:

- ◆ diffuse zytoplasmatische Färbung der Zellen
- ◆ zytoplasmatische Färbung nur in den basalen Anteilen der Zellen

- ◆ Färbung in der Nähe des Zellkernes korrespondierend zur Lokalisation des Golgi-Apparates

TGF- α ist ein auto-, para- und juxtakriner Regulator des normalen Wachstums und der embryonalen Entwicklung. Er fördert die Proliferation von Epithelien und epidermalen Zellen (WEIMANN und KIESS, 1995), gilt als potenter Promotor der Angiogenese (KUMAR et al., 1995) und beschleunigt die Wundheilung (SCHULTZ et al., 1987). In der embryonalen Entwicklung scheint TGF- α essentiell für die normale Entwicklung der Haarfollikel und Augen zu sein und eine Rolle in der Immunantwort zu spielen (KUMAR et al., 1995). Die Überexpression von TGF- α führt normalerweise zur Hyperplasie des betroffenen Gewebes und kann – muß aber nicht – zur Bildung von (malignen) Tumoren führen. Für Metastasierung dieser Tumore sind in aller Regel Co-Faktoren, wie z.B. das Ras-Protein, notwendig. Die fetale Überexpression von TGF- α ist nur selten mit Tumorbildung verbunden (KUMAR et al., 1995). Exogene Gaben von TGF- α zu Feten oder Neugeborenen führt bei Mäusen zum vorzeitigen Öffnen der Lidspalte und Durchbruch der Zähne (MARQUARDT et al., 1983, 1984).

Seine Wirkung vermittelt TGF- α ausschließlich durch die Bindung an den EGF-R. Die Bindung von TGF- α an den EGF-R führt zur Rezeptor-Dimerisierung und anschließender Auto-Phosphorylierung, was wiederum zur Aktivierung verschiedener zellulärer Kinase-Enzymkaskaden führt und letztendlich in der zellulären Antwort resultiert (Übersichten dazu bei KUMAR et al., 1995).

Die Wechselwirkungen zwischen TGF- α (bzw. EGF) und Steroiden sind vielfältig, wobei häufig nicht der Wachstumsfaktor selbst, sondern vielmehr sein spezifischer Rezeptor – also der EGF-R – den Angriffspunkt darstellt (MUKKU und STANCEL, 1985; IMAI et al., 1995; TAGA et al., 1995). MUKKU und STANCEL (1985) zeigten, daß die Gabe von Estradiol-17 β an unreife weibliche Ratten die EGF-R-Konzentrationen im Uterus vorübergehend deutlich erhöht. Dadurch kommt es im Uterus zu einer Erhöhung der EGF-Bindung um das Dreifache, ohne daß die Rezeptoraffinität verändert wird. Die EGF-abhängige Tyrosinkinaseaktivität steigt dementsprechend an. Diese Veränderungen sind spezifisch für Estradiol-17 β , da Progesteron, Dexamethason und Dihydrotestosteron keinen Anstieg bewirkten. Die Mitose und Differenzierung der uterinen Stromazellen ist bei Ratten

progesteroninduziert und wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren – unter anderem auch von TGF- α und EGF – verstärkt. Dabei können die Wachstumsfaktoren die Wirkung von Progesteron allerdings nicht ersetzen (PIVA et al., 1996). Die Untersuchungen von DAS et al. (1994) zeigen bezüglich Estradiol-17 β im Uterus von Mäusen ähnliche Ergebnisse wie die Untersuchungen von MUKKU und STANCEL (1985). Beim Menschen induzieren Estrogene in vivo und in vitro die Synthese von EGF, TGF- α und deren Rezeptor im Eileiter; aber nur EGF ist in das estrogeninduzierte Wachstum des Eileiters involviert (ADACHI et al., 1995). Im Endometrium variieren die Synthese und Expression von EGF, TGF- α und EGF-R in Abhängigkeit vom Menstruationszyklus, wobei die Expression von Rezeptor und Faktoren im Endometrium mit der Erhöhung des Serumestradiols assoziiert ist, nicht aber mit der Erhöhung der Progesteron-Konzentrationen (IMAI et al., 1995).

Die Beobachtungen, daß Estrogene die Synthese und Expression von EGF/TGF- α und deren Rezeptor induzieren, lassen vermuten, daß diese Wachstumsfaktoren eine Rolle in der Signalvermittlung der Steroidhormone am weiblichen Genitaltrakt spielen (IGNAR-TROWBRIDGE et al., 1992). Dabei wirken die Wachstumsfaktoren als Vermittler der steroidalen Wirkung, können aber nicht die endogene Steroidproduktion stimulieren (JOHNSON und CHATTERJEE, 1993).

2.3 *Wachstumsfaktor-Rezeptoren*

Für eine gerichtete Kommunikation bzw. einen gerichteten Informationsaustausch zwischen Zellen reicht es nicht aus, die dafür notwendigen Botenstoffe wie Wachstumsfaktoren oder Hormone zu produzieren. Vielmehr müssen diese Substanzen, um eine Wirkung erzielen zu können, mit ihren Zielzellen in Kontakt treten. Dafür stehen in den Zielzellen spezifische „Empfängerstrukturen“ – die sogenannten Rezeptoren – zur Verfügung. Diese Rezeptoren binden die ihnen funktionell zugeordneten Liganden in der Regel spezifisch, wobei die Ligandbindung den ersten Schritt der Übersetzung einer Ligandbotschaft für die Zelle darstellt (MEYER, 1994). Rezeptoren sind Proteinmoleküle bzw. Gruppen von Proteinmolekülen (FREY, 1996), die aufgrund ihrer Lokalisation an und in den Zellen in:

- ◆ zytoplasmatische Rezeptoren (für hydrophobe Moleküle) und

◆ membranständige Rezeptoren (für hydrophile Moleküle)

eingeteilt werden. Die membranständigen Rezeptoren werden zusätzlich noch nach Rezeptorsubtypen in *einfach* und *mehrfach membrangängige Rezeptoren* unterteilt (MEYER, 1994).

Die Rezeptoren der Wachstumsfaktoren zählen zu den einfach membrangängigen Rezeptoren und weisen einen weitgehend einheitlichen strukturellen Aufbau mit einer bemerkenswert einfachen und konstanten Grundarchitektur auf. Sie bestehen aus drei verschiedenen Regionen, welche extrazellulär, transmembranal und intrazytoplasmatisch lokalisiert sind. Der Aminoterminal des Rezeptorproteins ist dabei extrazellulär lokalisiert und trägt eine oder mehrere Ligandbindungsstellen. Daran schließt sich die transmembranale Region an, die in der Regel aus 23 – 25 hydrophoben (vorherrschend sind Leucin [31%], Valin [19%], Isoleucin [11%], Alanin [10%], Glycin [9%]) Aminosäuren mit einer einfachen α -helikalen Sekundärstruktur aufgebaut ist. Sie dient der Verankerung des Rezeptors in der Zellmembran, verbindet die extra- und intrazellulären Domänen miteinander und kann für die Übertragung des Ligandbindungssignales eine Rolle spielen. Die intrazytoplasmatische Region ist vorwiegend als einfache, lineare Peptidsequenz aufgebaut und stellt die Aktionsdomäne des Rezeptors dar (CZECH et al., 1990; MEYER, 1994). Viele der bisher untersuchten Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie z.B. EGF-Rezeptor, Platelet derived growth factor [PDGF]-Rezeptor, Insulin like growth factor [IGF] Typ 1-Rezeptor (MEYER, 1994) und der FGF-Rezeptor (GILLESPIE et al., 1992) enthalten in der Aktionsdomäne eine Tyrosinkinase und werden daher in die Untergruppe der Tyrosinkinase-Familie von einfach membrangängigen Rezeptoren eingeordnet. Diese Rezeptoren sind durch eine einheitliche Tyrosinkinase als Aktionsdomäne im Zytoplasma charakterisiert (MEYER, 1994). Alle Wachstumsfaktor-Rezeptoren besitzen innerhalb der intrazytoplasmatischen Domäne einen konservierten Abschnitt, der aus ca. 225 Aminosäuren besteht und große Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz aufweist. Innerhalb dieses Abschnitts befindet sich nicht nur die Tyrosinkinase, sondern auch eine potentielle Adenosintriphosphat (ATP)-Bindungsstelle, die immer in einer ähnlichen Position einen Lysin-Rest enthält. Dieser Lysin-Rest liegt 40 – 60 Aminosäuren von der transmembranalen Domäne entfernt und scheint für die Tyrosinkinase-Aktivierung von Bedeutung zu sein (CZECH et al., 1990).

Der Mechanismus, mit dem die Tyrosinkinase-Aktivität von Wachstumsfaktor-Rezeptoren spezifische zelluläre Antworten auslösen kann, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Dennoch weiß man, daß nach extrazellulärer Bindung des Ligands die intrazelluläre Tyrosinkinase aktiviert wird, welche dann durch selektive Phosphorylierung die Aktivierung jeweils zugeordneter Enzyme induziert. Über eine Kaskade von mehreren Enzymen kann die Wirkung eines Signales verstärkt werden (CZECH et al., 1990; MEYER, 1994;). Für die Funktion des Rezeptors – und damit für die Signalübertragung - spielt die Aktivierung der Tyrosinkinase eine besonders wichtige Rolle: Hemmt man die Rezeptor-Kinase-Aktivität, so kann trotz Ligandbindung keine zelluläre Antwort ausgelöst werden (EBINA et al., 1987).

2.3.1 Fibroblast Growth Factor-Rezeptor (FGF-R)

Alle FGF-sensitiven Zellen besitzen spezifische Rezeptoren für FGF-Liganden. Dabei handelt es sich um membranassoziierte Proteine, die FGF-Faktoren mit hoher Affinität und hoher Spezifität binden können (BAIRD und BÖHLEN, 1990). Die Anzahl der Rezeptoren pro Zelle wird in der Literatur kontrovers diskutiert: NEUFELD und GOSPODAROWICZ (1985) berichten, daß die Dichte der FGF-R auf normalen diploiden Zellen mit 10^3 bis 10^4 Rezeptoren/Zelle gering ist, während spezielle Zelllinien wie die „baby hamster kidney cells“ (BHK-21) eine deutlich höhere Dichte an FGF-R auf der Zelloberfläche aufweisen. In Bindungsstudien konnten auf den BHK-21-Zellen ca. 87 000 Bindungsstellen für aFGF und ca. 120 000 Bindungsstellen für bFGF pro Zelle nachgewiesen werden. BAIRD und BÖHLEN (1990) geben eine Rezeptoranzahl von 2 000 bis 80 000 pro Zelle an. NEUFELD und GOSPODAROWICZ (1985) gelang es, zwei unterschiedliche Rezeptoren mit Molekulargewichten von 125 bzw. 145 kDa für aFGF und bFGF darzustellen. aFGF hat eine höhere Affinität zum kleineren Rezeptor als bFGF, während bFGF eine höhere Affinität zum 145 kDa Rezeptor aufweist als aFGF. Dennoch können aFGF und bFGF an beide Rezeptoren binden und sich gegenseitig von ihren Bindungsstellen verdrängen. Spätere Untersuchungen zeigen, daß insgesamt vier FGF-R unterschieden werden können (FGF-R 1 bis FGF-R 4), welche durch das Auftreten von Isoformen sieben funktionell unterschiedliche Rezeptoren bilden (JOHNSON und WILLIAMS, 1993). In der Literatur wird der FGF-R 1 auch als *flg*, der FGF-R 2 auch als *bek* bezeichnet (SPIVAK-KROIZMAN et al., 1994).

FGF-Rezeptoren, welche den typischen Grundaufbau von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren aufweisen, sind einkettige Polypeptide, die - abhängig von Rezeptor-, Zelltyp und Isoform - Molekulargewichte von 110 bis 150 kDa aufweisen (BAIRD und BÖHLEN, 1990). Der extrazelluläre Anteil besteht aus zwei (β -Form) bzw. drei (α -Form) Immunglobulin-artigen (Ig-artigen) Schleifen und bestimmt die Ligandbindungsspezifität des Rezeptors (LEE et al., 1989; ORNITZ et al., 1996).

COULIER et al. (1996) zeigten, daß die FGF-R in der Evolution nur bei den Vertebraten gut konserviert sind und hohe verwandtschaftliche Beziehungen haben. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von 25 FGF-R aus zehn verschiedenen Spezies –Vertebraten und Avertebraten – ergab, daß bei den Vertebraten die Sequenzen der extra- und intrazellulären Domänen von FGF-R 1, FGF-R 2 und FGF-R 3 zu mehr als 80% identisch sind; die Sequenz von FGF-R 4 zeigt etwas größere Unterschiede. Die Sequenzen der vier untersuchten FGF-R bei Avertebraten zeigten im Vergleich mit den FGF-R-Sequenzen bei Vertebraten nur eine Identität von durchschnittlich 30% in der extrazellulären Domäne und 49 – 67% in der Kinasedomäne. In der Evolution treten die Veränderungen an der Kinasedomäne deutlich langsamer auf als in der extrazellulären Domäne. Die extrazellulären Domänen der FGF-R enthalten 22 Aminosäuren, die in allen Sequenzen auftauchen. Darin sind Cysteinreste enthalten, die an der Ig-artigen Schleifenbildung der Tertiärstruktur beteiligt sind. Bei den Avertebraten ist nur ein Gen zur Bildung von FGF-R vorhanden, während sich bei den Vertebraten zur Bildung von FGF-R eine ganze Genfamilie entwickelt hat.

Beim Säugetier existieren insgesamt vier Gene, die FGF-R kodieren (JOHNSON und WILLIAMS, 1993; COULIER et al., 1997). Durch alternatives Spleißen der pre-mRNA werden aus diesen vier Genen insgesamt sieben Rezeptor-Isoformen gebildet, welche sich in ihren Liganderkennungs- und Ligandbindungseigenschaften unterscheiden (JOHNSON und WILLIAMS, 1993). Bei den Spleißvorgängen werden im wesentlichen zwei Typen unterschieden, wobei der erste Spleißvorgang zum Überspringen eines Exons führt, welches die aminoterminal Ig-artige Schleife kodiert. Dadurch entstehen die β -Formen der FGF-R mit nur zwei Ig-artigen Schleifen (JOHNSON et al., 1991); die Ligandbindungseigenschaften der α - und β -Formen des Rezeptors sind ähnlich (ORNITZ et al., 1996). Der zweite Spleißtyp benutzt zwei einzelne Exons und führt in den FGF-R 1 bis 3 zur Bildung von jeweils drei

unterschiedlichen Versionen der extrazellulären Rezeptordomäne. In der dritten Ig-artigen Schleife wird die Aminosäuresequenz variiert, wobei die einzelnen Versionen als IIIa, IIIb und IIIc bezeichnet werden (JOHNSON et al., 1991; WERNER et al., 1992). IIIb und IIIc werden auf Zelloberflächen exprimiert und können FGF-Liganden binden, während IIIa nicht als vollständiger Rezeptor, sondern nur als sezerniertes extrazelluläres FGF-Bindungsprotein ohne bekannte Signalwirkung auftritt (DUAN et al., 1992). Der FGF-R 4 bildet keine Isoformen und tritt nur in der α -Form mit drei Ig-artigen Schleifen auf (GOLDFARB, 1996; ORNITZ et al., 1996). Die Expressionsmuster der FGF-R 1, FGF-R 2 und FGF-R 3 und ihrer Isoformen sind unterschiedlich und hängen von der jeweiligen Zelllinie ab: Die IIIb Varianten werden im epithelialen Gewebe und die IIIc Varianten vorwiegend im mesenchymalen Gewebe exprimiert (ORNITZ et al., 1996).

Durch die Ligandbindung werden Rezeptoren aktiviert. Bei Rezeptortyrosinkinasen führt die Ligandbindung zur Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase, welche zur Autophosphorylierung und Phosphorylierung spezifischer Zellsubstrate führt (GILLESPIE et al., 1992; MEYER, 1994). Bei Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität führt die Bildung von Rezeptordimeren zu einer Erhöhung der Kinaseaktivität, was die Autophosphorylierung und daraus resultierend die biologische Antworten der Zelle induziert (SCHLESSINGER und ULLRICH, 1992). Verschiedene Untersuchungen belegen, daß Heparin bzw. heparinartige Zelloberflächenmoleküle (z.B.: HPSG) notwendig sind, um nach Bindung von FGF an seine hochaffinen Rezeptoren eine biologische Antwort auszulösen (YAYON et al., 1991; ORNITZ et al., 1992). Damit konform sind die Beobachtungen von AMALRIC et al. (1994), daß HSPG für den Transport von exogen zugefügtem bFGF in den Zellkern notwendig sind. Dabei ist Heparin nicht für die Ligand-Rezeptor-Interaktion, sondern nur für die Induktion von Rezeptordimeren notwendig. Die Rezeptordimerisation selbst wird durch die multivalente Bindung von aFGF-Heparin-Komplexen an mehrere Rezeptoren induziert (SPIVAK-KROIZMAN et al., 1994). Dabei sind Größe und Sulfatierungsgrad der Heparin- und der HPSG-Moleküle bzw. der daraus abstammenden Oligosaccharide ausschlaggebend für die Verstärkung der aFGF-Wirkung. Ein mittlerer Sulfatierungsgrad und Kettenlängen von mindestens 16 Sacchariden sind notwendig, um die aFGF-Wirkung zu potenzieren (SUDHALTER et al., 1989).

Nach der Ligandbindung wird der Rezeptor mit dem gebundenen Liganden internalisiert und zum Zellkern transportiert. Im bzw. am Zellkern tritt neben dem intakten FGF-R α (Isoform mit drei Ig-artigen Schleifen) auch ein 40 kDa großer Komplex, bestehend aus dem aminoterminalen Fragment der extrazellulären Rezeptordomäne und dem gebundenen Liganden, auf. FENG et al. (1996) vermuten, daß die Bildung dieses Fragments und seine Translokation zum Zellkern eine zusätzliche Rolle in der FGF-Signaltransduktion spielen.

Die Regulation der FGF-Aktivität erfolgt durch die unterschiedliche Expression der einzelnen FGF-R-Isoformen mit ihren individuellen Bindungsspezifitäten und die unterschiedlichen Expressionsmuster der einzelnen FGF-Liganden - mit ihren individuellen Rezeptor-Erkennungsprofilen - in den unterschiedlichen Geweben. Die meisten FGF-Liganden können mehr als nur einen FGF-Rezeptor binden und aktivieren. FGF-3 aktiviert die IIIb-Isoformen der FGF-R 1 und 2, während FGF-7 nur die IIIb-Isoform des FGF-R 2 aktiviert. Die FGF-Liganden 4, 5, 6 und 8 aktivieren spezifisch die IIIc-Isoformen der FGF-Rezeptoren. Nur aFGF ist in der Lage, alle sieben funktionell unterschiedlichen FGF-R zu aktivieren (WERNER et al., 1992; GOLDFARB, 1996; ORNITZ et al., 1996).

2.3.2 Epidermal Growth Factor-Rezeptor (EGF-R)

Der EGF-R wurde in den frühen 80er Jahren von einer humanen Karzinomzelllinie (A-431) isoliert und war der erste Wachstumsfaktor-Rezeptor, der charakterisiert, sequenziert und kloniert wurde (COHEN, 1986).

Es handelt sich um ein an der Zelloberfläche von nahezu allen Säugetierzellen – ausgenommen den Zellen des hämatopoetischen Systems - exprimiertes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 170 kDa, das aus 1186 Aminosäuren aufgebaut ist (CARPENTER und WAHL, 1990). Seit 1995 wird in der Literatur auch von der Expression funktioneller EGF-R auf verschiedenen intrazellulären Organellen einschließlich des Zellkernes berichtet (CAO et al., 1995). Wie die anderen Wachstumsfaktor-Rezeptoren ist auch der EGF-R einfach membrangängig, gehört zur Tyrosinkinase-Familie und hat den typischen Grundaufbau der Wachstumsfaktor-Rezeptoren mit extrazellulärer, transmembranaler und intrazytoplasmatischer Domäne (MEYER, 1994). Neuere Untersuchungen zeigen, daß der EGF-R in verschiedenen Rezeptorsubtypen auftritt

und, ähnlich wie der FGF-R, eine Rezeptor-Familie bildet. Bisher sind vier Mitglieder dieser Familie bekannt: Der zuerst entdeckte „klassische“ EGF-R wird heute auch als **humaner EGF-Rezeptor (HER 1)** oder **erbB 1** bezeichnet, die später entdeckten Subtypen wurden fortlaufend nummeriert: **HER 2/erbB 2**, **HER 3/erbB 3** und **HER 4/erbB 4** (RAAB und KLAGSBRUN, 1997).

Beim klassischen EGF-R besteht die extrazelluläre Domäne aus 622 Aminosäuren; sie enthält die Ligandbindungsstelle des Rezeptors und bildet den Aminoterminus des Proteins. Auffallend sind der hohe Gehalt an N-glykosilierten Oligosacchariden, welche bis zu 30% der extrazellulären Domäne ausmachen und teilweise aus Mannose bestehen, sowie das Fehlen von O-glykosilierten Oligosacchariden und der hohe Cysteingehalt von ca. 10%. Die Cysteine können bis zu 25 Disulfidbrücken bilden, wobei die genaue Anzahl der tatsächlich gebildeten Brücken unbekannt ist (CARPENTER und WAHL, 1990). Das Vorkommen von Mannose in den Kohlenhydratketten von Membranproteinen ist ungewöhnlich und wird von CARPENTER und WAHL (1990) als Signal für den lysosomalen Abbau interpretiert. Die transmembranale Domäne besteht aus 22 Aminosäuren, ist hydrophob und dient der Verankerung des Rezeptors in der Zellmembran. Der intrazellulär liegende Carboxyterminus des EGF-R besteht aus 542 Aminosäuren und enthält neben der Tyrosinkinase, welche eine ATP-Bindungsstelle beinhaltet, noch viele Bindungsstellen für die Phosphorylierung von Serin bzw. Threonin (HEISERMAN und GILL, 1988), wobei die Phosphorylierung dieser Aminosäuren durch Proteinkinasen katalysiert wird (CARPENTER und WAHL, 1990).

Der EGF-R ist – ähnlich wie der FGF-R - ein in der Evolution konserviertes Protein. Der humane und der EGF-R des Vogels sind zu 78% identisch. Die Tyrosinkinase-Sequenz des humanen EGF-R weist zu der des Huhnes eine extrem hohe Homologie von >95% auf (CARPENTER und WAHL, 1990). Eine gekürzte Form des humanen EGF-R ist homolog zum onkogenen Erythroblastosevirusprodukt des Affen (v-erbB) (WEIMANN und KIESS, 1995).

Das Gen für den EGF-R liegt beim Menschen auf Chromosom 7, bei der Maus auf Chromosom 11; für Huhn und Rind sind die Genloci bisher nicht bekannt. Auf Chromosom 2 von Drosophila wurde ein zum EGF-R-Gen homologes Gen gefunden (CARPENTER und WAHL, 1990). Beim Menschen umfaßt das EGF-R-Gen annähernd 110kb DNA und besteht aus 26 Exons, welche die Rezeptorsequenz

kodieren, und 25 Introns, welche eine Größe von 270 bis 20 000 Basenpaare haben und die Exons voneinander trennen. Exon 1 beinhaltet die Signalsequenz des Proteins, Exon 2 bis 14 kodieren die extrazelluläre Domäne, Exon 15 kodiert die transmembranale Domäne, und Exon 16 bis 26 kodieren die intrazelluläre Domäne (HALEY et al., 1987). Strukturanalysen des Gens und Aminosäuresequenz-Analysen des Genproduktes lassen vermuten, daß die extrazelluläre Domäne des EGF-R durch eine Duplikation einer cysteinreichen Region entstanden ist (CARPENTER und WAHL, 1990). Die vier Subtypen des EGF-R haben eine ausgeprägte Homologie. Besonders die aus 290 Aminosäuren bestehende intrazytoplasmatische Tyrosinkinase und die zwei cysteinreichen Abschnitte der extrazellulären Domäne sind stark konserviert (CARRAWAY und CANTLEY, 1994; EARP et al., 1995).

Wie die Biosynthese des EGF-R reguliert wird, ist bis heute nicht genau geklärt. BJORGE und KUDLOW (1987) vermuten eine Beteiligung der Proteinkinase C, während andere Autoren (HALEY et al., 1987) beschreiben, daß Substanzen wie Glukokortikoide und Retinolsäure die Transkription des Rezeptor-Gens modulieren. Verschiedene Autoren zeigen, daß die Expression des EGF-R durch Steroide wie Estrogene und Progesteron reguliert werden kann (MUKKU und STANCEL, 1985; IMAI et al., 1995; TAGA et al., 1995). Sicher ist, daß nach Transkription der pre-mRNA durch Spleißen eine reife mRNA gebildet wird. Im endoplasmatischen Retikulum erfolgen dann die Translation der mRNA und die Glykosilierung des gebildeten Proteins. Im Golgi-Apparat findet die endgültige Reifung des Rezeptors und der Transport zur Zelloberfläche statt (CARPENTER und WAHL, 1990).

Nach Ligandbindung an den EGF-R bilden sich durch Zusammenlagerung mehrerer Rezeptoren große Rezeptor-Ligand-Komplexe in „coated pit areas“ der Zellmembran aus. Durch Endozytose werden diese aneinander gelagerten Rezeptor-Ligand-Komplexe in die Zelle aufgenommen, wo sie anschließend verschiedene Zellkompartimente durchlaufen bis die Rezeptoren und Liganden im Lysosom abgebaut werden. Nur wenige Rezeptoren bleiben erhalten und können an die Zellmembran rezirkulieren. Die Mechanismen, mit denen die Rezeptoren intrazellulär - nach Abbau bzw. Rezirkulieren - sortiert werden, sind bis heute unbekannt. CARPENTER und WAHL (1990) vermuten, daß die N-Glykosilierung des

Rezeptorproteins und das Vorkommen von Mannose in den Kohlenhydratseitenketten daran beteiligt sind.

Die Aktivierung des EGF-R durch seine Liganden erfolgt sowohl auf auto- und parakrinem (LADINES-LLAVE et al., 1993; FILLA und KAUL, 1997) als auch auf juxtakrinem Weg (ANKLESARIA et al., 1990).

Die vier verschiedenen Subtypen des EGF-R werden mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten von den einzelnen Liganden der EGF-Familie aktiviert: EGF, TGF- α und Amphiregulin (AR) binden und aktivieren HER 1; Neuregulin (NRG) 1 und 2 binden an HER 3 und HER 4, aktivieren aber nur HER 4. Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) und Betacellulin (BTC) binden und aktivieren HER 1 und HER 4 (Tabelle bei RAAB und KLAGSBRUN, 1997). Nach Ligandbindung kommt es zur raschen Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste in der intrazytoplasmatischen Domäne des Rezeptors. Diese phosphorylierten Aminosäuren können als Bindungsstelle für verschiedene Effektormoleküle (z.B.: second messenger-Moleküle) dienen, welche dann die weitere Signaltransduktion innerhalb der Zelle vermitteln. Die Auswirkungen der ligandabhängigen Rezeptoraktivierung auf eine Zelle hängt vom jeweiligen Rezeptor-Subtyp, vom gebundenen Liganden und der betroffenen Zelle ab (WEIMANN und KIESS, 1995). Im Allgemeinen kommt es nach Ligandbindung und Autophosphorylierung des EGF-R sowohl zu verschiedenen „Sofortreaktionen“, als auch zu „Spätreaktionen“ – also verzögerten Zellantworten. Die „Sofortreaktionen“ der Zelle beinhalten die Aktivierung der zellulären „second-messenger-Systeme“ wie z.B.: die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, der Inositol-Triphosphate, des Diacylglycerols und verschiedener Phospholipasen, welche durch die EGF-induzierte Tyrosinkinase-Aktivität phosphoryliert werden. Auch die Stimulation verschiedener Transportsysteme zählt zu den Sofortreaktionen der Zelle (KLEINSTEIN et al., 1993; MÜHLHAUSER et al., 1993). Die „Spätreaktionen“ umfassen die Induktion spezifischer mRNA, z.B.: für Onkogene (z.B.: c-fos, c-myc, c-jun) oder Protoonkogene und die DNA-Synthese (MÜHLHAUSER et al., 1993). Durch die Aktivierung des EGF-R wird die Zellproliferation – bes. von Epithelien und epidermalen Zellen – und die Zelldifferenzierung vermittelt. Für die Mitogenität ist nicht nur die Aktivierung des Rezeptors, sondern auch die Internalisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes in die Zelle notwendig. Nach Internalisierung des

Rezeptor-Ligand-Komplexes kommt es zum Abbau des Wachstumsfaktors und/oder des Rezeptors. So wird durch die Aufnahme des Rezeptor-Ligand-Komplexes zunächst die DNA-Synthese aktiviert und durch den darauffolgenden Abbau des Wachstumsfaktors der mitogene Stimulus für die Zelle beseitigt (WEIMANN und KIESS, 1995).

Da bekannt war, daß eine gekürzte Form des EGF-R homolog zum v-erb-B-Onkogenprotein des Affen-Erythroblastosevirus ist, wurde eine Vielzahl von Tumoren auf die Expression der EGF-R untersucht. Im Vergleich zu den normalen Zellen weisen viele Tumorzellen erhöhte EGF-R-Konzentrationen und erhöhte Rezeptorgenkopien auf (WEIMANN und KIESS, 1995). Besonders intensiv wurde die Tumorzelllinie A-431 untersucht, welche aus einem humanem Epidermoidkarzinom entstammt und den EGF-R überexprimiert. Die meisten biochemischen und molekularen Informationen über den EGF-R wurden durch Untersuchungen dieser Zelllinie erlangt (CARPENTER und WAHL, 1990). Auch auf vielen Mammatumoren läßt sich der EGF-R nachweisen. Dabei korreliert die EGF-R-Überexpression positiv mit der Größe des Tumors und dem zunehmenden Befall axillärer Lymphknoten. Dennoch kann keine zusätzliche Information über die individuelle Prognose der einzelnen Patientin gewonnen werden (BECKMANN et al., 1995).

Der EGF-R wurde im Uterus von Nagetieren (MUKKU und STANCEL, 1985; DAS et al., 1994), Schwein (KENNEDY et al., 1994; KLIEM et al., 1998) und Rind (PÖHLAND und TIEMANN, 1994) und in den Ovarien von Katze (GÖRITZ et al., 1996), Schwein (SINGH et al., 1995) und Rind (PÖHLAND und TIEMANN, 1994) nachgewiesen. GHARIB-HAMOUCHE et al. (1993) beschreiben die Expression von EGF-R auf dem Trophoblasten des Schafes bereits ab dem 15. Tag der Trächtigkeit. Auch beim Pavian wurden der EGF-R und seine Liganden im Uterus während des Zyklus und in der Trächtigkeit gefunden, wobei die Expression des Rezeptors und seiner Liganden in den Stromazellen mit dem Beginn der Plazentation korreliert (SLOWEY et al., 1994).

Beim Menschen wurde der EGF-R im Reproduktionstrakt beider Geschlechter nachgewiesen. DeBELLIS et al. (1996) beschreiben die Expression und zelluläre Lokalisation des Rezeptors und seiner Liganden in der Prostata. Bei der Frau wurde in unzähligen Untersuchungen der EGF-R im Eileiter (ADACHI et al., 1995), Uterus (KLEINSTEIN et al., 1993; HOFMANN und SCOTT, 1995), Endometrium

(HOFMANN und SCOTT, 1995), in der Plazenta bzw. im Trophoblast (MARUO und MOCHIZUKI, 1987; KAWAGOE et al., 1990; DUELLO et al., 1994; GENBACEV et al., 1994; CAO et al., 1995; TAGA et al., 1995), in Amnionzellen (TAHARA et al., 1995) und der Nabelschnur (RAO et al., 1995) gefunden.

Viele dieser Untersuchungen beschäftigen sich mit der Expression des EGF-R und seiner Liganden im Endometrium des graviden Uterus und deren Funktionen auf die Invasion, Differenzierung und Proliferation des Trophoblasten und der Plazenta (z.B.: MARUO und MOCHIZUKI, 1987; DUELLO et al., 1994; GENBACEV et al., 1994; CAO et al., 1995), wobei teilweise widersprüchliche Aussagen gemacht werden; MARUO und MOCHIZUKI (1987) finden bei ihren immunhistologischen Untersuchungen der humanen Plazenta den EGF-R ausschließlich im Synzytiotrophoblasten, wobei das Signal auf der äußeren Zellmembran und im Zytoplasma nachweisbar war, mit stärkster Ausprägung im frühen ersten Trimester; mit fortschreitender Gravidität aber nimmt die Intensität deutlich ab. Im Gegensatz dazu fanden KAWAGOE et al. (1990) den EGF-R nur auf der Zelloberfläche von Synzytiotrophoblastzellen und Zytotrophoblastzellen, beobachten aber keine Veränderungen im Verteilungsmuster und der Signalintensität im Verlaufe der Gravidität. DUELLO et al. (1994) fanden den EGF-R im ersten Trimester sowohl im Zytotrophoblasten als auch im Synzytiotrophoblasten und im fetalen Bindegewebe. Im letzten Trimester reagieren Synzytiotrophoblast und Zytotrophoblast nur noch sehr schwach bzw. sind negativ, während das fetale Bindegewebe intensiv reagiert. Dabei können verschiedene Färbemuster unterschieden werden, die nebeneinander in einer Zotte oder parallel in verschiedenen Zotten auftreten können:

- ◆ einzelne Zottenabschnitte zeigen positiv reagierende Zytotrophoblast- und Synzytiotrophoblastzellen
- ◆ Zottenabschnitte mit negativen Zytotrophoblastzellen und intensiv positiv reagierendem Mikrovillisaum der Synzytiotrophoblastzellen
- ◆ Zottenabschnitte mit positiven Zytotrophoblastzellen und negativen Synzytiotrophoblastzellen

MÜHLHAUSER et al. (1993) fanden den Rezeptor im proliferativen Trophoblasten und mit fortschreitender Gravidität auch im differenzierten Trophoblasten der Zotten.

Einigkeit herrscht darüber, daß der EGF-R und seine Liganden im Trophoblast-Gewebe exprimiert werden. Die gleichzeitige Expression des EGF-R und seiner Liganden im humanen Trophoblasten und in Chorionkarzinomen läßt auf eine autokrine bzw. parakrine Stimulation der Trophoblastproliferation (LADINES-LLAVE et al., 1993; FILLA und KAUL, 1997), mit fortschreitender Gravidität auch der Trophoblastdifferenzierung (MÜHLHAUSER et al., 1993) schließen.

Wechselwirkungen zwischen Wachstumsfaktoren und Hormonen werden zum Teil durch die Modifikationen der spezifischen Wachstumsfaktor-Rezeptoren vermittelt. Die Injektion von Estradiol-17 β bewirkt bei juvenilen Ratten innerhalb von 6 bis 12 Stunden eine massive Erhöhung der EGF-R-Konzentrationen im Uterus, welche auf eine „de-novo“-Synthese zurückzuführen ist (MUKKU und STANCEL, 1985). Auch in ovariectomierten Mäusen führt Estradiol-17 β zur Erhöhung der uterinen EGF-R-Konzentrationen (DAS et al., 1994). Umgekehrt können aber auch Wachstumsfaktoren die Wirkungen von Steroidhormonen modulieren. EGF ist ein wichtiger autokriner/parokriner Vermittler des estrogeninduzierten Wachstums und der Differenzierung im Endometrium (KLEINSTEIN et al., 1993). Die Wirkungen werden dabei durch eine starke Erhöhung der nukleären Estrogenrezeptor-Konzentrationen erzielt (IGNAR-TROWBRIDGE et al., 1992). Auch in Granulosazellen von Ratten hat man die Wechselwirkung von EGF mit Steroidhormonen beobachtet. Die Zugabe von EGF zu kultivierten Granulosazellen aus der Ratte führte zur deutlichen Erhöhung der Progesteronsynthese, was ein Absenken der Apoptose-Rate in diesen Zellen nach sich zog (LUCIANO et al., 1994). Die Wechselwirkungen zwischen den Wachstumsfaktoren/Wachstumsfaktor-Rezeptoren und Steroiden/Steroidrezeptoren scheinen dabei sehr differenziert zu sein. Weder MUKKU und STANCEL (1985) (juvenile Ratten) noch KLEINSTEIN et al. (1993) (Präimplantationsphase Kaninchen, Präovulationsphase Mensch) konnten einen Einfluß von Progesteron auf die Expression des EGF-R beobachten, während LUCIANO et al. (1994) bei ovariectomierten Mäusen durch Progesteron die Expression des Wachstumsfaktor-Rezeptors im Uterus steigern konnten. Allerdings zeigten diese progesteroninduzierten Rezeptoren keine Bioaktivität. Die Untersuchungen von ADACHI et al. (1995) zeigen, daß in Eileiterzellen des Menschen die Konzentrationen der mRNA von TGF- α , EGF und EGF-R durch Estrogene deutlich erhöht werden, aber nur EGF und EGF-R – nicht aber TGF- α - in das estrogeninduzierte Wachstum des Eileiters involviert sind. Das bedeutet, daß

eine Erhöhung der Expression von Wachstumsfaktoren nicht unbedingt auch zur Erhöhung ihrer Aktivität führen muß. Auch die erhöhte Synthese bzw. erhöhte Expression des EGF-R bedeuten nicht gleichzeitig auch eine erhöhte Bioaktivität des Rezeptors (LUCIANO et al., 1994).

Auch im Mammakarzinom des Menschen, in dem sowohl Steroidhormonrezeptoren als auch der EGF-R exprimiert werden können, vermutete man Wechselwirkungen zwischen dem Wachstumsfaktor und den Steroiden. Besonders auffallend ist, daß häufig die Kombination „Estrogenrezeptor negativ“ und „EGF-R positiv“ auftritt (UMEKITA et al., 1992). Der positive EGF-R-Nachweis korrelierte dabei mit größeren Tumoren und einer erhöhten Anzahl von Lymphknotenmetastasen. Zwischen der EGF-R-Überexpression und dem Gehalt von Estradiol-17 β und Progesteron konnte jedoch keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden (BECKMANN et al., 1995). Dagegen ist der maligne Phänotyp des Mammakarzinoms häufig mit einer verringerten Expression des Estrogenrezeptors und der EGF-R-Überexpression vergesellschaftet, wobei der Estrogenrezeptor spezifisch die Expression des EGF-R beeinflusst (DeFAZIO et al., 1997).

3 Material und Methoden

3.1 *Immunhistochemische Untersuchungen*

3.1.1 Allgemeine Grundlagen

Immunhistochemische Untersuchungen dienen dem Nachweis und der Lokalisation von Antigenen in Geweben und Zellen mit Hilfe spezifischer Antikörper. Diese Reaktion ist eine der spezifischsten im biologischen Bereich und läßt sich nicht nur im Körper, sondern auch unter Laborbedingungen auslösen. Durch geeignete Markierung kann der Ort der Reaktion im Gewebe sichtbar gemacht werden (BOURNE, 1989).

3.1.1.1 Begriffe

Antigene (Ag): Ag sind Substanzen, die in einem Wirtsorganismus die Bildung von Antikörpern induzieren können, wobei ein Antigen in der Regel über mehrere sogenannte antigene Determinanten (Epitope) verfügt, die jeweils die Bildung eines eigenen Antikörpers induzieren können (KAUFMANN, 1991).

Antikörper (AK): AK sind Proteine, die in der Gammaglobulinfraktion des Blutserums enthalten sind und oft auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet werden. Man teilt sie aufgrund verschiedener Kriterien wie Größe, Gewicht, Struktur und Funktion in fünf Klassen ein: Immunglobulin A (IgA), Immunglobulin D (IgD), Immunglobulin E (IgE), Immunglobulin G (IgG) und Immunglobulin M (IgM). Bei immunhistochemischen Untersuchungen werden überwiegend AK vom Typ IgG, selten auch IgM, eingesetzt (BOURNE, 1989).

Polyklonale Antikörper (pAK): pAK stellen einen Pool aus verschiedenen AK dar, die gegen die unterschiedlichen Epitope eines einzigen Ag gerichtet sind. Diese verschiedenen AK unterscheiden sich nicht nur in dem Typ der Ig-Klasse und Subklassen, sondern auch in ihrer Spezifität und Affinität gegenüber dem Antigen (BOURNE, 1989).

Der Vorteil der Anwendung pAK in der Immunhistologie liegt darin, daß sie auch bei Proben eingesetzt werden können, bei denen es durch die Gewebeaufbereitung zu Veränderungen an einzelnen Epitopen des Antigens gekommen ist. Nachteilig ist dagegen das erhöhte Risiko von Kreuzreaktionen. Als Kreuzreaktionen bezeichnet

man zum einen die spezifische Bindung eines AK mit einem auf verschiedenen Antigenmolekülen auftretenden identischen Epitop, zum anderen aber auch die Reaktion eines AK mit ähnlichen oder unterschiedlichen Epitopen, gegen die der AK selbst nicht gerichtet ist (BOENISCH, 1989; KAUFMANN, 1991).

Monoklonale Antikörper (mAK): mAK sind AK einer Ig-Klasse/Subklasse, die nur gegen ein einziges Epitop eines Ag gerichtet sind. Sie weisen daher eine wesentlich höhere Bindungsspezifität als polyklonale AK auf. Nachteilig bei Verwendung in der Immunhistologie ist jedoch, daß der mAK nicht mehr binden kann, wenn durch die Gewebe- oder Probenaufbereitung das gesuchte Epitop verändert oder beschädigt wird. Auch kann bei sehr geringen Antigenkonzentrationen die Detektionssensitivität des monoklonalen AK zu gering sein (KAUFMANN, 1991).

3.1.2 Möglichkeiten zur Darstellung der Ag-AK-Reaktion

3.1.2.1 Direkte Methoden

Bei diesen rasch durchführbaren Methoden ist der gegen das nachzuweisende Ag gerichtete AK markiert und kann so nach Bindung im Präparat direkt lokalisiert werden. Direkte Methoden weisen kaum unspezifische Reaktionen auf. Da die Sensitivität jedoch relativ gering ist, werden sie nur noch selten angewandt (BOENISCH, 1989).

3.1.2.2 Indirekte Methoden

Bei indirekten Methoden folgen mehrere Inkubationsschritte aufeinander, wobei das zu suchende Ag zunächst den Primärantikörper (AK I) bindet. Dieser Immunkomplex wird anschließend mit Hilfe verschiedener Techniken im Präparat lokalisiert, wobei jeweils der Sekundärantikörper (AK II) markiert ist (BOENISCH, 1989; JACKSON und BLYTHE, 1995). In den vorliegenden Untersuchungen wurde von Anfang an auf die 2-Schritt-Methode unter Verwendung eines biotinylierten AK II zurückgegriffen.

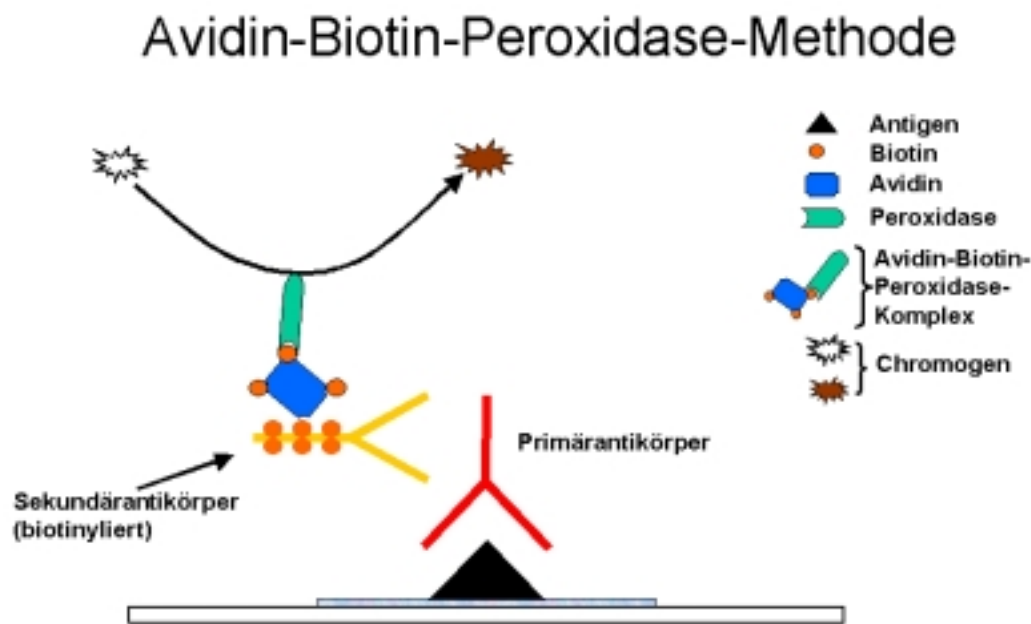


Abbildung 3: Darstellung der Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode

3.1.2.2.1 Avidin-Biotin-Methoden

Diese Technik nutzt die starke Affinität des Glykoproteins Avidin bzw. Streptavidin für Biotin aus. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für das Vitamin und Coenzym Biotin. Man unterscheidet zwei verschiedene Avidin-Biotin-Färbemethoden – die Avidin-Biotin-Enzym-Komplex-Methode (ABC-Methode) und die „markierte Avidin-Biotintechnik“ (labelled avidin-biotin technique [LAB-Technik]).

Im Falle der ABC-Methode, wird ein Avidin-Biotin-Komplex an ein Enzym – meistens handelt es sich um Peroxidase – gekoppelt. Mindestens eine der vier Bindungsstellen für Biotin muß an jedem Avidinmolekül frei bleiben. Das Enzym Peroxidase wird an das im Avidin gebundene Biotin gekoppelt. So entsteht ein vorgeformter Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (kommerziell erhältlich), der noch freie Bindungsstellen für Biotin aufweist. Mit diesen freien Bindungsstellen kann der Komplex an den biotinylierten AK II binden. Durch Zusatz von Substrat (Wasserstoffperoxid [H_2O_2]) und Chromogen (z.B.: DAB, AEC) wird die Lokalisation

des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes sichtbar gemacht und damit das gesuchte Ag im Gewebe markiert (siehe Kapitel: 3.1.3, unten).

Bei der LAB-Technik wird das Enzym Peroxidase direkt an das Avidinmolekül gebunden, so daß die Biotinbindungsstellen frei bleiben. Auch hier bindet Avidin an das Biotin des AK II. Das Färbeverfahren entspricht dem der ABC-Technik.

Vorteil dieser Avidin-Biotin-Methoden ist die hohe Sensitivität, die weitgehend aus der Signalverstärkung der 2-Schritt-Technik und der überaus hohen Affinität des Avidin gegenüber Biotin und dem milden chemischen Biotinylierungsprozeß der AK resultiert (BOENISCH, 1989).

3.1.3 Lokalisation der Ag-AK-Reaktion

Zur Lokalisation der nachzuweisenden zellulären Antigene ist es notwendig, die gebildeten Immunkomplexe sichtbar zu machen. Dies erfolgt dadurch, daß entweder der AK I oder AK II mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder Enzym markiert sind. Während der Fluoreszenzfarbstoff direkt nach Eingehen der Bindung nachgewiesen werden kann, erfolgt beim Einsatz von Enzymen die Sichtbarmachung durch eine Substratumsetzung mit Hilfe von Chromogenen. Chromogene sind farblose, lösliche Substanzen, die durch chemische Reaktionen wie Oxidation oder Bindung an Salze zu unlöslichen und farbigen Produkten umgewandelt werden. Die Reaktionsprodukte präzipitieren am Ort ihrer Entstehung und markieren so die Lage der gesuchten Antigene im Gewebe. Häufig in der Immunhistologie eingesetzte Chromogene sind 3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) und 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC), wobei DAB nach Oxidation ein braunes Präzipitat bildet, das in Wasser, Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln unlöslich ist und polymerisiert, während AEC unter Oxidation ein rosarotes Farbprodukt bildet, welches in Alkohol löslich und wasserunlöslich ist (BOENISCH, 1989).

3.1.4 Gewebepräparation

Um in der Immunhistochemie aussagefähige und verwertbare Ergebnisse zu erzielen, ist es notwendig, die Proben mit reproduzierbaren Methoden optimal zu konservieren und zu fixieren. In Abhängigkeit vom Gewebetyp, der Untersuchungsmethoden (Zytologie, Histologie, Elektronenmikroskopie) und der

geplanten Färbemethode werden unterschiedliche Verfahren zur Konservierung und Fixierung verwendet (Übersichten siehe: BOURNE, 1989).

Durch die Konservierung sollen die morphologischen Strukturen soweit als möglich erhalten und die Präparate vor Autolyse und Verwesung geschützt werden. Gleichzeitig soll ein Schutz vor den mechanischen, chemischen und physikalischen Beanspruchungen während des Färbeprozesses erreicht werden. Auch die Fixierung dient der Gewebeerhaltung. Außerdem soll sie die Diffusion der Ag in andere Zellkompartimente bzw. das vollständige Auswaschen der Ag verhindern, damit der Antigen-Nachweis durch die Immunhistochemie tatsächlich in situ erfolgt (FARMILO und STEAD, 1989; JACKSON und BLYTHE, 1995).

Obwohl sehr viele verschiedene Substanzen zur Gewebefixierung zur Verfügung stehen, werden hauptsächlich Aceton, Alkohole oder formaldehydhaltige Fixierlösungen benutzt. Formalinhaltige Fixierlösungen sind gewebeverträglich und zeigen eine gute Penetration. Durch die Ausbildung von Quervernetzungen sind die histologischen Strukturen meistens gut erhalten. Dennoch sollte in Vorversuchen für jedes Gewebe und für jedes nachzuweisende Ag eine optimale Fixierung ausgetestet werden (FARMILO und STEAD, 1989).

3.1.4.1 Paraffineinbettung

Fixierte Gewebeproben können nach Entwässerung in Paraffin eingebettet werden. Das Entwässern und Einbetten erfolgt meistens in Einbettungsautomaten, in denen die Gewebelöcke (Würfel von bis zu 10 mm Kantenlänge) eine aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol durchlaufen (Dehydrierung) und anschließend mit 60°C warmen Paraffin durchtränkt werden. Das Paraffin härtet bei der Abkühlung aus und formt mit der eingebetteten Probe einen schneidbaren Gewebeblock. Die Lagerung kann bei Zimmertemperatur oder im Kühlschrank erfolgen. Konstante Lagerungsbedingungen sind bei längerfristiger Nutzung eines Blockes wichtig, um die Haltbarkeit des Gewebes zu erhöhen. Die dunkle, kühle und trockene Lagerung hat sich bei paraffineingebettetem Gewebe bewährt (FARMILO und STEAD, 1989).

3.1.4.2 Kryostatpräparation

Bei diesem Verfahren werden die zu untersuchenden Proben entweder direkt nativ oder nach Fixierung in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die eingefrorenen

Präparate können längerfristig bei Temperaturen von -20° bis -80°C gelagert oder sofort einer immunhistochemischen Färbung unterzogen werden (FARMILO und STEAD, 1989; BOENISCH, 1989).

3.1.5 Probleme des immunhistologischen Antigen-Nachweises

3.1.5.1 Durch die Gewebepräparation bedingte Probleme

3.1.5.1.1 Fixierung und Konservierung

Da alle Fixativa ihre protektive Wirkung ausschließlich durch Änderung der ursprünglichen chemischen Zusammensetzung der betroffenen Gewebes erreichen, stellt jede Fixierung ein Kompromiß zwischen Erhaltung der morphologischen Strukturen und Erhaltung des chemischen und antigenen Profils dar (JACKSON und BLYTHE, 1995).

Zu schwache Fixierungen können zum einen die Diffusion von Ag nicht verhindern und resultieren zum anderen in einer schlechten Gewebeerhaltung, was die Lokalisation der dargestellten Substanzen erschwert bzw. unmöglich macht. Bei zu starken Fixierungen kann es zur massiven Maskierung oder Denaturierungen der Gewebeproteine, und damit auch der Ag, kommen. Als Maskierung bezeichnet man die ausgeprägte Aldehydvernetzung von Proteinen, die antigene Bindungsstellen abdeckt, aber nicht zerstört. Durch die Behandlung einer Probe mit proteolytischen Enzymen, welche die Quervernetzungen spalten, können maskierte Antigene zumindest teilweise wieder freigelegt werden. Die Denaturierung führt dagegen zu irreversiblen Strukturveränderungen der Proteine, was in Veränderungen des chemischen und antigenen Profils resultiert (FARMILO und STEAD, 1989).

3.1.5.1.2 Paraffineinbettung

Eine Paraffineinbettung geht immer mit erheblichen physikalischen und chemischen Belastungen des Gewebes einher. Dies kann zu strukturellen Veränderungen und damit zur Zerstörung von Epitopen führen, was sich nachteilig auf die sich anschließende Immunfärbung auswirken kann. Insbesondere beim Einsatz von monoklonalen AK muß man sorgfältige Kontrollen durchführen, um „richtig negative“ Ergebnisse von Signalverlusten durch Ag-Zerstörung während der Einbettung unterscheiden zu können (BOENISCH, 1989).

3.1.5.1.3 Kryostatpräparation

Durch Bildung von Eiskristallen kann es bei dieser Technik zur Zerstörung von Zellstrukturen kommen, die aufgrund der schlechten Gewebeerhaltung dann zu Schwierigkeiten in der Lokalisation von Ag führen (BOURNE, 1989).

3.1.5.2 Hintergrundreaktivität

Als Hintergrundreaktivität bezeichnet man alle Färbereaktionen des Gewebes, die nicht das Resultat der spezifischen Ag-AK-Bindung sind. Die Ursachen dafür sind vielfältig und lassen sich in folgende Gruppen unterteilen (BOENISCH, 1989):

- ◆ Elektrostatische und hydrophobe Interaktionen
- ◆ Endogene Enzymaktivität
- ◆ Kreuzreaktivität
- ◆ Antikörper vermittelte Hintergrundreaktion

3.1.5.2.1 Elektrostatische und hydrophobe Interaktionen

Entgegengesetzte elektrische Ladungen von Gewebeproteinen und AK-Proteinen führen zur unspezifischen Anlagerung der Proteinkomponenten aneinander. Da bei den meisten AK der isoelektrische Punkt zwischen 5,8 und 7,3 liegt, weisen die Ig bei pH-Werten von 7,0 bis 7,8 negative Oberflächenladungen auf und neigen deshalb zur Anlagerung an positiv geladene Proteine in den zu untersuchenden Proben.

Hydrophobie ist eine Eigenschaft, die - in wechselndem Ausmaß – bei den meisten Proteinen auftritt und zu den natürlichen Kräften zählt, die der Tertiärstruktur eines Peptides ihre Stabilität verleihen. Von den für die Histologie wichtigen Serumproteinen sind gerade die Ig besonders hydrophob. Generell neigen hydrophobe Moleküle zur gegenseitigen Vernetzung, um dadurch die wasserabstoßende Wirkung zu steigern. Solche auf Hydrophobie beruhende Vernetzungen können auch zwischen den Proteinen des fixierten Gewebes und den in der Immunhistologie eingesetzten AK auftreten.

Zur Reduktion der hydrophobie- bzw. elektrostatisch bedingten Hintergrundreaktion hat sich der Einsatz von blockierenden Proteinlösungen, entweder als Inkubation vor der Zugabe des AK I oder als Zusatz im Verdünnungspuffer, bewährt. Als Proteinlösungen verwendet man sogenannte „Non-Immunseren“, das sind Blutseren

von nicht immunisierten Tieren, oder bovines Serumalbumin (BSA). Die Proteine dieser Lösungen sättigen die Gewebeladungen ab. Stammen die blockierenden Proteine aus derselben Spezies wie der AK II, verhindern sie zusätzlich dessen unspezifische Anlagerung an Gewebekomponenten der zu untersuchenden Probe.

Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Gewebe- und Reagenzproteinen liegt in der Zugabe von Detergenzien, welche als Zugabe in den Puffern oder als eigenständiger Waschschrift angewendet werden (siehe Kapitel: 3.2.6.3.4, Seite 58).

3.1.5.2.2 Endogene Enzymaktivität

Die in der Immunhistochemie verwendeten Enzyme können als endogene Enzyme auch in Geweben enthalten sein. So ist die Peroxidaseaktivität eine allgemeine Eigenschaft von Hämoproteinen: Hämoglobin (Erythrozyten), Myoglobin (Muskelzellen), Zytochrome (Granulozyten, Monozyten), Katalasen (Niere, Leber). Eine Farbreaktion bei einer immunhistochemischen Untersuchung kann so auch auf eine solche endogene Enzymaktivität des Gewebes zurückzuführen sein. Daher ist es wichtig vor Beginn der eigentlichen Immunreaktion, endogene Gewebeenzyme zu unterdrücken bzw. zu blockieren. Dieses geschieht auf Basis der Substratinhibition der Enzyme, indem vor der Immunreaktion das Gewebe mit einem Substratüberschuß inkubiert wird. Die Aktivität der endogenen Peroxidase blockiert man mit H_2O_2 , die der alkalischen Phosphatase mit Levamisol. Erwartet man in einem Gewebe sehr hohe Enzymaktivitäten, so sollte man bei dem Nachweisverfahren nach Möglichkeit auf ein anderes Enzym ausweichen.

Auch das Avidin-bindende Biotin kommt als endogenes Vitamin und Coenzym in vielen Geweben (Leber, Niere), meist an Enzyme oder andere Proteine gebunden, vor. Störungen bei der Immunreaktion treten aber nur sehr selten auf. Endogenes Biotin wird durch das Hinzufügen von Avidin blockiert.

3.1.5.2.3 Kreuzreaktivität

Eine Kreuzreaktivität tritt dann auf, wenn das Epitop des gesuchten Gewebeantigens auch auf anderen Proteinen vorkommt. Dieses Phänomen kann zufällig bei völlig unterschiedlichen Proteinen auftreten oder ist Ausdruck von hohen Strukturähnlichkeiten zwischen Proteinen (Isoformen eines Proteins), auf alle Fälle

aber eine spezifische Ag-AK-Reaktion. In seltenen Fällen tritt auch eine unspezifische Kreuzreaktion eines AK mit ähnlichen („Epitopmimikry“) oder gar gänzlich unterschiedlichen Epitopen anderer Antigene auf. In den eigenen Untersuchungen hat es ein solches Phänomen bei einem der eingesetzten Sekundärantikörper gegeben (siehe Kapitel: 3.2.6.3.3, Seite 58).

Die Kreuzreaktivität kann durch sorgfältige Herstellung und Auswahl der zu verwendenden Antiseren eliminiert werden.

3.1.5.2.4 Antikörper vermittelte Hintergrundreaktion

Wenn in den Antiseren natürliche und kontaminierende AK gegen das in der Immunhistologie zu untersuchende Ag auftreten, kann es zu Hintergrundreaktionen kommen, welche die Ergebnisse der Untersuchung verfälschen. Natürliche AK entstehen durch antigene Umwelteinflüsse, während kontaminierende AK bei der gezielten Immunisierung von Wirtstieren entstehen, da die in der Immunisierung eingesetzten isolierten Ag nur selten wirklich rein sind. Produziert das Immunsystem des Wirtes AK gegen die Epitope dieser Verunreinigungen, so kommt es zur Entstehung der kontaminierenden AK.

Die meisten natürlichen und kontaminierenden AK treten in nur sehr geringen Konzentrationen auf, so daß deren Reaktivität durch ausreichend hohe Verdünnung der im Versuch eingesetzten Antiseren ausschaltet werden kann.

3.2 *Eigene Untersuchungen*

3.2.1 Gewinnung und Fixierung des Probenmaterials

3.2.1.1 Plazentome

Untersucht wurden die Plazentome von Rindern verschiedener Trächtigkeitsstadien und unter der Geburt. Die Besamungszeitpunkte der Kühe waren bekannt.

Für die Probengewinnung wurden jeweils drei Kühe am Tag 150, Tag 220, Tag 240 und Tag 270 der Trächtigkeit (Tage post inseminationem) im Gießener Schlachthof geschlachtet. Unmittelbar nach der Betäubung durch Bolzenschuß und Eröffnung der A. carotis und der V. jugularis wurde die Bauchhöhle eröffnet, der Uterus vorgelagert

und samt Inhalt entnommen. Nach Eröffnung des Uterus wurden jeweils vier bis fünf Plazentome aus verschiedenen Lokalisationen markiert. In die fetalen Gefäße dieser Plazentome wurde eine abgestumpfte Butterfly-Kanüle eingeführt. Anschließend wurden die Plazentome zunächst mit Natriumphosphat-Puffer (siehe Kapitel: 9.1.3, Seite 168) von Blut freigespült und danach mit 4%igem phosphatgepuffertem Formalin perfundiert (siehe Kapitel: 9.1.3, Seite 168) bis sie eine feste Konsistenz annahmen. Die perfundierten Plazentome wurden in etwa 6 mm dicke Scheiben geschnitten und für 36 Stunden in 4%igem phosphatgepuffertem Formalin immersionsfixiert.

Zusätzlich wurden von 5 Kühen aus dem Patientengut der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen im Rahmen von Kaiserschnitten zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt Plazentome entnommen. In jedem Fall wurden gesunde Feten entwickelt. Diese Plazentome wurden nach der Entwicklung der Kälber am Karunkelstiel ligiert, abgesetzt und mit Natriumphosphat-Puffer abgespült. Anschließend wurden diese Plazentome auch in etwa 6 mm dicke Scheiben geschnitten und ohne Perfusion für 36 Stunden in 4%igem phosphatgepuffertem Formalin immersionsfixiert.

3.2.1.2 Kontrollgewebe

Alle als Positivkontrollen eingebetteten Gewebe (Corpus luteum cyclicum des Rindes [polyklonaler bFGF-AK]; Koronarvene des Rindes [FGF-Rezeptor-AK]; humane Präputialhaut [TGF- α -AK]; Mammakarzinom [EGF-Rezeptor-AK]) wurden analog zu den Plazentomen der Geburtstiere lediglich mit Natriumphosphat-Puffer abgespült und für 36 Stunden in 4% phosphatgepuffertem Formalin immersionsfixiert.

3.2.2 Einbettung des Probenmaterials

3.2.2.1 Plazentome

Für die Einbettung in Paraffin wurden die Plazentomscheiben aller Plazentome mit Natriumphosphat-Puffer abgespült, in tortenstückförmige Gewebelöcke, die sich über alle Schichten des Plazentoms erstreckten, geschnitten und im Einbettautomaten (siehe Kapitel: 9.1.1, Seite 162) des Instituts für Veterinär-

Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen nach folgendem Protokoll entwässert und eingebettet:

Schritt:	Reagenz:	Konzentration:	Temperatur:	Vakuum:	Zeit:
1	Isopropanol	70%	RT	ja	15 min
2	Isopropanol	80%	RT	ja	15 min
3	Isopropanol	96%	RT	ja	15 min
4	Isopropanol	100%	RT	ja	15 min
5	Isopropanol	100%	RT	ja	15 min
6	Xylol	-	RT	ja	15 min
7	Xylol	-	RT	ja	15 min
8	Paraffin	-	60°C	ja	15 min
9	Paraffin	-	60°C	ja	15 min
10	Paraffin	-	60°C	ja	15 min

3.2.2.2 Kontrollgewebe

Die als Positivkontrollen eingesetzten Gewebe wurden in Würfel von ca. 6 mm Kantenlänge geschnitten und anschließend genauso wie die Plazentomstücke im Einbettautomaten entwässert und eingebettet.

Alle Paraffinblöcke wurden dunkel und trocken bei Raumtemperatur im Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen gelagert.

3.2.3 Herstellung der Gewebeschnitte

3.2.3.1 Objektträgerbeschichtung

Um die Haftung der histologischen Schnitte auf den Objektträgern zu erhöhen, wurden diese mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES) (siehe Kapitel: 9.1.3, Seite 168) beschichtet. Dazu wurden die vorgereinigten Objektträger 20 Sekunden in einer 2%igen APES-Lösung gebadet und anschließend jeweils zweimal in Aceton reinst und in Aqua destillata (A. dest.) gespült. Anschließend wurden die Objektträger in offenen Glasküvetten unter dem Abzug luftgetrocknet und dann in geschlossenen Gefäßen staubarm bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.3.2 Schneiden der Proben

Um die Bearbeitung der Paraffinblöcke zu erleichtern, wurden diese vor dem Schneiden für 24 Stunden bei 4°C im Kühlschrank gekühlt und anschließend bei

Raumtemperatur am Mikrotom (Fabrik-Nr.: 23076; Reichardt Jung AG, Heidelberg) in 2 µm dicke Schnitte geschnitten. Als Messer wurden Einmalklingen der Firma Leica (Einmalklingen Modell 819, ST 14036826457; Messerhalter: Halterset: 24 cm lang, 2 Andrückplatten; Leica Vertrieb GmbH, Bensheim) verwendet.

Die frischen 2 µm dicken Paraffinschnitte wurden mit Hilfe eines Holzspans und eines handelsüblichen Roßhaarpinsels von der Schneidekante der Einmalmesser abgehoben und in einem mit A. dest. gefüllten Wasserbad bei 38° bis 40°C bis zur Streckung der Schnitte gebadet (Wasserbad Typ WB - 24; V 220; W 550; Fabrik-Nr.: 8810, max. 90°C; MEDAX Nagel KG Kiel). Nach der Streckung der Schnitte wurden diese auf die beschichteten Objektträger aufgezogen und im Wärmeschränk (Memmert, Typ: 3 26, F. Nr: 340 073, 220 Volt, 380 Watt, 50/60 Hz, Din 12880-Kl. 0) bei 37°C für 20 Stunden getrocknet und anschließend bis zum Einsatz im Versuch bei -20°C in der Tiefkühltruhe gelagert (siehe Kapitel: 3.2.6.1, Seite 56).

3.2.4 Herstellung und Lagerung der verwendeten Lösungen

3.2.4.1 Blutsera für die Herstellung der Blockierlösungen

Das Blut stammt ausschließlich von institutseigenen Tieren. Die Blutproben wurden frisch entnommen und, nach Verbringung in das Labor, sofort bei 3000 U/min für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert, filtriert (Einmal-Filterhalter, FP 030/3, steril, pyrogenfrei, Schleicher & Schuell) und für 20 Minuten im Wasserbad bei 56°C inaktiviert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Alle aus den Blutseren hergestellten Arbeitsverdünnungen wurden mit „Phosphate buffered saline-Puffer“ (PBS-Puffer) (siehe Kapitel: 9.1.3, Seite 168) direkt vor Gebrauch hergestellt.

3.2.4.2 Primärantikörper (AK I)

Die Lyophilisate der AK I wurden mit sterilfiltriertem A. dest (Einmal-Filterhalter, FP 030/3, steril, pyrogenfrei, Schleicher & Schuell) rückgelöst und dabei 1:10 vorverdünnt und aliquotiert. Die Lagerung der Aliquote erfolgte bei -70°C, das jeweilige Arbeitsaliquot wurde bei -20°C gelagert. Alle aus den Aliquoten hergestellten Arbeitsverdünnungen wurden mit PBS-Puffer direkt vor Gebrauch hergestellt.

3.2.4.3 Sekundärantikörper (AK II)

Die Lyophilisate der AK II wurden mit jeweils 1 ml sterilfiltriertem A. dest (Einmal-Filterhalter, FP 030/3, steril, pyrogenfrei, Schleicher & Schuell) rückgelöst und bei Kühlschranktemperatur (4 - 8°C) gelagert. Alle aus diesen Antiseren hergestellten Arbeitsverdünnungen wurden mit PBS-Puffer direkt vor Gebrauch hergestellt.

3.2.4.4 Avidin-Biotin-Komplex

Die Lösungen des Peroxidase Vectastain® ABC-Kit PK-4000 (siehe Kapitel: 9.1.2.1, Seite 163) wurden bei Kühlschranktemperatur (4 - 8°C) gelagert. Die daraus hergestellten Arbeitslösungen wurden nach Anweisungen des Herstellers im Datenblatt 30 Minuten vor Gebrauch mit PBS-Puffer hergestellt (siehe Kapitel: 9.1.3, Seite 168).

3.2.4.5 Sonstige Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden laut Rezeptvorschrift (siehe Kapitel: 9.1.3, Seite 168) direkt vor Gebrauch hergestellt.

3.2.5 Immunhistochemisches Nachweisverfahren

Als Technik wurde das indirekte Nachweisverfahren der Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode (ABC-Methode, siehe Kapitel: 3.1.2.2.1, Seite 45) unter Verwendung verschiedener AK I und AK II und des kommerziell erhältlichen Peroxidase-ABC-Kits der Firma Vector ausgewählt. Als Chromogen wurde DAB (siehe Kapitel: 9.1.2.1, Seite 163) eingesetzt.

Diese Technik ermöglicht auch den Nachweis von geringen Antigenkonzentrationen in formalinfixierten und paraffineingebetteten Geweben. Die Empfindlichkeit dieser Methode beruht auf der Zwei-Schritt-Technik, bei der es durch den Einsatz konjugierter AK II - welche an das Fc-Fragment des AK I binden – zu einer Signalverstärkung kommt. Außerdem verschaffen auch die hohe Affinität von Avidin gegenüber Biotin (Dissoziationskonstante 10^{-19}M) und der vergleichsweise schonende Biotinylierungsprozeß der AK II dieser Methode eine höhere Sensitivität im Vergleich zu den übrigen immunhistochemischen Verfahren (BOENISCH, 1989).

3.2.6 Vorversuche zur Optimierung der immunhistochemischen Nachweisreaktionen

Mit Hilfe von Vorversuchen wurden für die einzelnen AK geeignete Versuchsprotokolle erarbeitet (siehe Kapitel: 3.2.8, Seite 61). Dabei wurden sowohl unterschiedliche Lagerungsbedingungen der histologischen Schnitte vom Schneiden bis zum Einsatz im Versuch, als auch verschiedene Versuchsabläufe ausgetestet. Alle eingesetzten AK wurden zunächst einem „Standard-Protokoll“ unterzogen, welches aufgrund der Erfahrungen der Arbeitsgruppe, den Empfehlungen der Literatur (BOURNE, 1989) und der Datenblätter der verschiedenen AK zunächst als geeignet erschien. Um das Färbeergebnis für jeden AK zu optimieren – d. h. Verstärkung des spezifischen Signals bei gleichzeitiger Reduktion der Hintergrundreaktion – wurden verschiedene Behandlungen der Schnitte ausgetestet, wobei von Protokoll zu Protokoll immer nur ein einziger Parameter variiert wurde. Damit war es möglich, Veränderungen im Färbeergebnis auf die einzelnen Behandlungen zurückzuführen. Jeweils ein Block aus dem vorangegangenen Versuch wurde als „Referenzschnitt“ im neuen Protokoll mitgeführt. So konnten blockspezifische Reaktionen von protokollbedingten Veränderungen des Färbemusters unterschieden werden. Das für den jeweiligen AK am besten geeignete Versuchsprotokoll wurde anschließend durch Wiederholung mehrfach getestet und so die Ergebnisse auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft. Dabei wurden außerdem die verschiedenen Paraffinblöcke der einzelnen Probestiere auf ihr Färbeverhalten untersucht. Die im Folgenden aufgeführten Untersuchungen mußten für jeden einzelnen AK in eigenen Versuchsreihen durchgeführt werden.

3.2.6.1 Untersuchungen zum Einfluß der Lagerungsbedingungen der Gewebeschnitte auf das Färbeverhalten

Von den einzelnen Paraffinblöcken wurden Schnittserien angefertigt. Einige der Präparate wurden nach dem Schneiden und Trocknen direkt im Versuch eingesetzt, während die anderen Präparate unterschiedlich lange bei Raumtemperatur (RT) trocken und dunkel in Präparatekästen für die Histologie gelagert wurden, bis sie unter Verwendung des gleichen immunhistologischen Protokolls gefärbt wurden. Parallel dazu wurden einige Präparate nach dem Schneiden und Trocknen sofort bei -20°C eingefroren und ebenfalls unterschiedlich lange gelagert. In nur wenigen Versuchen zeigte sich, daß für den immunhistologischen Nachweis von

Wachstumsfaktoren das Lagern der frisch angefertigten Schnitte bis zum Einsatz im Versuch bei Raumtemperatur nachteilig ist. Schon innerhalb weniger Tage nimmt die Antigenität der Schnitte – und damit auch die Färbeintensität in der Immunhistologie – deutlich ab, bis es nach einigen Wochen zum völligen Verlust des Signals kommt. Im Gegensatz dazu führte die Lagerung bei -20°C auch nach Monaten zu keinem Verlust der Antigenität der Präparate. Aus diesem Grund wurden die angefertigten histologischen Schnitte in den Hauptversuchen entweder unmittelbar nach ihrer Herstellung im Versuch eingesetzt oder zunächst bei -20°C gelagert.

3.2.6.2 Ermittlung der optimalen Verdünnungen der AK I, AK II und des ABC-Komplexes

Im ersten Versuch wurden jeweils 3 Schnitte eingesetzt, wobei jeweils von Tag 150 als „frühes Stadium“, von Tag 270 als „spätes Stadium“ und vom Tag der Geburt ein Schnitt ausgewählt wurde. Der AK I wurde dabei zunächst in der vom Hersteller im Datenblatt empfohlenen Konzentration eingesetzt. Je nach Ergebnis dieses Pilotversuches wurden dann Verdünnungsreihen angefertigt. Zu Beginn der Untersuchungen wurde zusätzlich die Dauer der Inkubation variiert. Da die Inkubation über Nacht höhere Verdünnungsstufen bei gleichbleibender Färbeintensität ermöglichte, wurden nachfolgend alle AK I über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die AK II wurden grundsätzlich in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnungsstufe eingesetzt, da die Erfahrungen der Arbeitsgruppe zeigte, daß durch Variation der AK II-Verdünnungen keine Verbesserung der Färbeergebnisse erzielt werden konnte. Gleiches gilt auch für die Inkubationsdauer der AK II.

Die Anwendung des ABC-Komplex erfolgte ausschließlich nach den vom Hersteller im Datenblatt angegebenen Vorschriften und wurde nicht variiert.

3.2.6.3 Untersuchungen zur Dämpfung der Hintergrundreaktivität

3.2.6.3.1 Behandlung mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

Zur Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte mit H_2O_2 behandelt (siehe: 3.1.5.2.2, Seite 50). Verschiedene Konzentrationen und Inkubationszeiten wurden erprobt, wobei zu hohe Konzentrationen ($>2\%$ H_2O_2) und zu lange Inkubationen (mehr als 20 Minuten) deutliche Schädigungen am Gewebe

hervorriefen (Ablösen der Schnitte vom OT, Verschlechterung der histologischen Morphologie). Die 20 minütige Inkubation der Schnitte in 0,3%iger H_2O_2 -Lösung erwies sich als geeignet und wurde in den Hauptversuchen benutzt.

3.2.6.3.2 Einwirkung von blockierenden Proteinlösungen

Zur Unterdrückung unspezifischer Reaktionen durch elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Gewebeproteinen und den verschiedenen Antiseren wurden die Präparate mit Non-Immunseren behandelt. Eine 30minütige Inkubation mit 10%igem Non-Immunserum bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer erwies sich als geeignet. Außerdem wurde die Zugabe von bis zu 2% BSA zu den Waschpuffern und den Antiseren ausgetestet. Da Letzteres die Hintergrundreaktion nicht dämpfen konnte, wurde auf diese Behandlung in den Hauptversuchen verzichtet.

3.2.6.3.3 Einsatz unkonjugierter AK II

Bei der Färbung des TGF- α ist es zur unspezifischen Färbereaktion des eingesetzten AK II gekommen. Daher war es notwendig, Präparate mit einem unkonjugierten AK II der gleichen Spezies und Ig-Klasse bzw. Ig-Subklasse zu präinkubieren. So wurden die unspezifischen Bindungsstellen des konjugierten AK II durch die Präinkubation blockiert.

3.2.6.3.4 Einsatz von Detergenzien

Zur Reduktion der hydrophoben Wechselwirkungen wurden die Schnitte in verschiedenen Detergenzienlösungen (z.B.: Tween 20[®], Triton X 100[®]) unterschiedlicher Konzentrationen und über abgestufte Zeiten inkubiert. Dabei zeigte sich, daß es bei Anwendung von Triton X 100[®], auch in geringen Dosierungen (< 0,5%), zu einem fast vollständigen Verlust der Antigenität und einer deutlichen Beeinträchtigung der histologischen Struktur der Schnitte kam. Die Anwendung einer 20 minütigen Inkubation mit 0,1% Tween 20[®] in PBS-Waschpuffer führte dagegen deutlich zur Verminderung der Hintergrundreaktion.

3.2.6.4 Untersuchungen zur Demaskierung gesuchter Epitope

3.2.6.4.1 Behandlungen in der Mikrowelle

Zur Antigendemaskierung (siehe Kapitel: 3.1.5, Seite 48) wurden die Schnitte in kochenden Zitratpuffer verbracht und anschließend für 0, 5, 10, 15 oder maximal 20 Minuten in der Mikrowelle (800 Watt) gekocht. Dabei wurden die Behandlungen in jeweils direkt aufeinanderfolgende fünf-minütige Abschnitte unterteilt (1 x 5 Min, 2 x 5 Min, 3 x 5 Min, 4 x 5 Min), damit das Austrocknen der Schnitte beim Verkochen des Zitratpuffers durch die Zugabe von neuem heißen Zitratpuffer verhindert werden konnte. Längere Behandlungen in der Mikrowelle führten zur Zerstörung der Präparate und wurden daher nicht benutzt. In Abhängigkeit vom eingesetzten AK erwies sich die Behandlung mit der Mikrowelle als unterschiedlich effektiv. Für die im Hauptversuch eingesetzten AK zeigten sich nach einer Behandlung für 2 bzw. 3 x 5 Minuten in der Mikrowelle die besten Ergebnisse (siehe Kapitel: 3.2.8, Seite 61).

3.2.6.4.2 Enzymatische Vorverdauung

Ebenfalls zur Antigendemaskierung wurden die Präparate für 5, 10 und 15 Minuten in Proteinase-K-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen (5, 10, 20, 30 µg Proteinase K in 200 ml PBS-Waschpuffer) eingesetzt. Dabei kam es allerdings schon bei der geringsten Konzentration zu starken Gewebeschädigungen, weshalb in den Hauptversuchen von Vorverdauungen der Präparate abgesehen wurde.

3.2.7 Allgemeine Beschreibung der Versuche

Alle Behandlungen, Inkubationen und Waschschrte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt; ausgenommen davon sind nur die Inkubationen mit den AK I, welche bei 4°C erfolgten, und die unten beschriebene Antigendemaskierung mit Zitratpuffer in der Mikrowelle.

Die Inkubationen erfolgten in einer feuchten Kammer, alle übrigen Behandlungen wurden in Küvetten durchgeführt.

Nach Entnahme aus dem Gefrierschrank und Auftauen der Präparate bei Raumtemperatur wurden diese zunächst durch zweimal 10 minütiges Baden in Xylol entparaffiniert und zur Rehydrierung über eine absteigende Alkoholreihe (je fünf Minuten in Ethanol absolutus I, Ethanol absolutus II, Ethanol 96%, Ethanol 80%,

Ethanol 70%, Ethanol 50%) in A. dest. überführt. Daran schloß sich ein Waschvorgang in PBS-Puffer von fünf Minuten an.

Bei allen Färbungen - mit Ausnahme des FGF-Rezeptors (FGF-R) - war es notwendig, die Präparate durch Baden und anschließendes Kochen in Zitratpuffer für die Immunfärbung vorzubereiten. Danach wurden die Präparate bei Raumtemperatur 20 Minuten in einer 0,3%igen Wasserstoffperoxid-Lösung (H_2O_2 -Lösung) gebadet (Blockierung der endogenen Peroxidase). Es folgte ein Waschschrift von dreimal fünf Minuten in PBS. Daraufhin wurden die Schnitte 30 Minuten in einer feuchten Kammer mit 10%igem Blutserum behandelt. Das Serum wurde nach der Inkubation mit einer Pumpe (KNF, Neuberger, 78 Freiburg, Typ: No 035.1.2, AN.18) abgesaugt und anschließend sofort der AK I aufpipettiert. Die Inkubation der AK I erfolgte jeweils für 20 Stunden bei 4°C in einer feuchten Kammer. Nach der Inkubation wurde überschüssiger AK I durch dreimal fünf-minütiges Waschen mit PBS entfernt und anschließend der jeweilige AK II aufpipettiert. Dieser inkubierte für 30 Minuten. Auch hier wurde der AK-Überschuß durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt. Die ABC-Lösung wurde nach den Vorgaben des Herstellers angesetzt (9 µl Lösung A + 9 µl Lösung B pro 1ml PBS) und die Schnitte damit für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert und anschließend dreimal für fünf Minuten in PBS-Puffer abgespült. Zur Verbesserung der Färbereaktion wurden die Schnitte 20 Minuten lang in einer 0,1%igen Detergenzienlösung (Tween 20®) gebadet.

Nun erfolgte die eigentliche Färbereaktion indem die Präparate in einer dunklen Kammer auf dem Magnetrührer der DAB-Lösung ausgesetzt wurden. Überschüssiges DAB wurde durch einen weiteren Waschschrift von dreimal 5 Minuten in A. dest. entfernt.

Zur besseren Orientierung im Schnitt wurden die Präparate für zwei Sekunden mit einer Hämatoxilin-Lösung gegengefärbt und für 10 Minuten unter fließendem, kalten Leitungswasser gebläut.

Über eine aufsteigende Alkoholreihe (je 2 Minuten Ethanol 70%, Ethanol 90%, Ethanol 96%, Ethanol absolutus I, Ethanol absolutus II) wurden die Präparate entwässert, dann in Xylol überführt und abschließend in Eukitt eingebettet.

3.2.8 Immunhistologische Nachweise

Die folgenden Kapitel geben für die einzelnen Antikörper die genauen Versuchsprotokolle wieder:

3.2.8.1 Immunhistologischer Nachweis von aFGF

3.2.8.1.1 Benutzte Antiseren

Serum: 10% Ziegenserum in PBS-Puffer

AK I: polyklonaler Kaninchen anti Rinder aFGF-Faktor IgG; UBI/Biomol [1:40]

AK II: biotinylierter Ziege anti Kaninchen IgG (H+L-Kette); Vector BA-1000
[1:200]

NK: Kaninchenserum, inaktiviert am 20-08-97 bei 56°C für 20 min [1:1300]

3.2.8.1.2 Versuchsprotokoll

- ◆ Entparaffinieren: 2 x 10 Min. Xylol
- ◆ Rehydrieren: je 5 Min. in Ethanol absolutus I, Ethanol absolutus II, Ethanol 96%, Ethanol 80%, Ethanol 70%, Ethanol 50% und A. dest.
- ◆ 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 5 Min. Zitratpuffer
- ◆ 3 x 5 Min. in Mikrowelle kochen
- ◆ 20 Min. Abkühlung bei RT
- ◆ 20 Min. 0,3%iges H₂O₂-Bad
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 30 Min. 10%iges Ziegenserum; absaugen
- ◆ 20 Std. AK I bzw. Non-Immunserum in 1:40er Verdünnung bei 4°C
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 30 Min. AK II: Vector BA-1000, 1:200er Verdünnung
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 30 Min. ABC-Lösung
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 20 Min. 0,1%ige Tween 20[®]-Lösung
- ◆ Abspülen mit PBS

- ◆ 2 Min. DAB-Lösung
- ◆ 3 x 5 Min. A. dest.
- ◆ 2 Sek. gegenfärben mit Hämatoxin
- ◆ eindecken mit Eukitt®: je 2 Min. Ethanol 70%, Ethanol 90%, Ethanol 96%, Ethanol absolutus I, Ethanol absolutus II, Xylol I, Xylol II.

3.2.8.2 Immunhistologischer Nachweis von bFGF

3.2.8.2.1 Verfahren 1

3.2.8.2.1.1 *Benutzte Antiseren*

Serum: 10% Pferdeserum in PBS-Puffer

AK I: monoklonaler Maus anti Rinder bFGF-Faktor IgG1 κ ;UBI/Biomol [1:50]

AK II: biotinylierter Pferd anti Maus IgG (H+L-Kette); Vector BA-2000 [1:200]

NK: monoklonaler Maus anti Clostridium perfringens-Toxin IgG1 κ ;

Dr. Lothar Wieler, damals Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen [1:50]

3.2.8.2.1.2 *Versuchsprotokoll*

- ◆ Entparaffinieren: 2 x 10 Min. Xylol
- ◆ Rehydrieren: je 5 Min. in Ethanol absolutus I, Ethanol absolutus II, Ethanol 96%, Ethanol 80%, Ethanol 70%, Ethanol 50% und A. dest.
- ◆ 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 5 Min. Zitratpuffer
- ◆ 3 x 5 Min. in Mikrowelle kochen
- ◆ 20 Min. Abkühlung bei RT
- ◆ 20 Min. 0,3%iges H₂O₂-Bad
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 30 Min. 10%iges Pferdeserum; absaugen
- ◆ 20 Std. AK I bzw. Substitutions-AK in 1:50er Verdünnung bei 4°C
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 30 Min. AK II: Vector BA-2000 [1:200]
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 30 Min. ABC-Lösung
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer

- ◆ 20 Min. 0,1%ige Tween 20[®]-Lösung
- ◆ Abspülen mit PBS
- ◆ 4 Min. DAB-Lösung
- ◆ 3 x 5 Min. A. dest.
- ◆ 2 Sek. gegenfärben mit Hämatoxilin
- ◆ eindecken mit Eukitt[®]: je 2 Min. Ethanol 70%, Ethanol 90%, Ethanol 96%, Ethanol absolutus I, Ethanol absolutus II, Xylol I, Xylol II.

3.2.8.2.2 Verfahren 2

3.2.8.2.2.1 Benutzte Antiseren

Serum: 10% Ziegenserum in PBS-Puffer

AK I: polyklonaler Kaninchen anti Rinder bFGF-Faktor; Prof. Schams, Weihenstephan [1:1300]

AK II: biotinylierter Ziege anti Kaninchen IgG (H+L-Kette); Vector BA-1000 [1:200]

NK: Kaninchenserum, inaktiviert am 20-08-97 bei 56°C für 20 min [1:1300]

3.2.8.2.2.2 Versuchsprotokoll

- ◆ Entparaffinieren: 2 x 10 Min. Xylol
- ◆ Rehydrieren: je 5 Min. in Ethanol absolutus I, Ethanol absolutus II, Ethanol 96%, Ethanol 80%, Ethanol 70%, Ethanol 50% und A. dest.
- ◆ 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 5 Min. Zitratpuffer
- ◆ 3 x 5 Min. in Mikrowelle kochen
- ◆ 20 Min. Abkühlung bei RT
- ◆ 20 Min. 0,3%iges H₂O₂-Bad
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 30 Min. 10%iges Ziegenserum; absaugen
- ◆ 20 Std. AK I bzw. Non-Immunserum in 1:1300er Verdünnung bei 4°C
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 30 Min. AK II Vector BA-1000, 1:200er Verdünnung
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 30 Min. ABC-Lösung
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer

- ◆ 20 Min. 0,1%ige Tween 20[®]-Lösung
- ◆ Abspülen mit PBS
- ◆ 1,5 Min. DAB-Lösung
- ◆ 3 x 5 Min. A. dest.
- ◆ 2 Sek. gegenfärben mit Hämatoxilin
- ◆ eindecken mit Eukitt[®]: je 2 Min. Ethanol 70%, Ethanol 90%, Ethanol 96%, Ethanol absolutus I, Ethanol absolutus II, Xylol I, Xylol II.

3.2.8.3 Immunhistologischer Nachweis von TGF- α

3.2.8.3.1 Benutzte Antiseren

- Serum: 10% Kaninchenserum in PBS-Puffer
- AK I: polyklonaler Schaf anti human TGF- α -Faktor; Calbiochem [1:2000]
- AK 2: unkonjugierter polyklonaler Kaninchen anti Schaf IgG (H+L-Kette); Vector AI-6000 [1:200]
- AK II: biotinylierter Kaninchen anti Schaf IgG (H+L-Kette); Vector BA-6000 [1:200]
- NK: Schafserum, vom 30-04-97, inaktiviert bei 56°C für 20 min [1:2000]

3.2.8.3.2 Versuchsprotokoll

- ◆ Entparaffinieren: 2 x 10 Min. Xylol
- ◆ Rehydrieren: je 5 Min. in Ethanol absolutus I, Ethanol absolutus II, Ethanol 96%, Ethanol 80%, Ethanol 70%, Ethanol 50% und A. dest.
- ◆ 5 Min. PBS-Puffer mit 2% BSA
- ◆ 5 Min. Zitratpuffer
- ◆ 2 x 5 Min. in Mikrowelle kochen
- ◆ 20 Min. Abkühlung bei RT
- ◆ 20 Min. 0,3%iges H₂O₂-Bad
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer mit 2% BSA
- ◆ 30 Min. 10%iges Kaninchenserum, absaugen
- ◆ 30 Min. unkonj. AK II, Vector AI-6000, 1:200er Verdünnung; absaugen
- ◆ 20 Std. AK I bzw. Non-Immunserum in 1:2000er Verdünnung bei 4°C
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 30 Min. AK II Vector BA-6000, 1:200er Verdünnung

- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 30 Min. ABC-Lösung
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 20 Min. 0,1%ige Tween 20®-Lösung
- ◆ Abspülen mit PBS
- ◆ 2 Min. DAB-Lösung
- ◆ 3 x 5 Min. A. dest.
- ◆ 2 Sek. gegenfärben mit Hämatoxin
- ◆ eindecken mit Eukitt®: je 2 Min. Ethanol 70%, Ethanol 90%, Ethanol 96%, Ethanol absolutus I, Ethanol absolutus II, Xylol I, Xylol II.

3.2.8.4 Immunhistologischer Nachweis des FGF-Rezeptors

3.2.8.4.1 Benutzte Antiseren

Serum: 10% Ziegenserum in PBS-Puffer

AK I: monoklonaler Maus anti Rinder FGF-Rezeptor IgM; Klon: VBS 1;
Chemicon MAB 125 [1:75]

AK II: biotinylierter Ziege anti Maus IgM (H+L-Kette); Vector BA-2020 [1:200]

NK: monoklonaler Maus IgM κ , Clon C48-6, Epitop gegen Trinitrophenol-KLH
(keyhole limpet hemocyanin) gerichtet, Pharmingen International [1:75]

3.2.8.4.2 Versuchsprotokoll

- ◆ Entparaffinieren: 2 x 10 Min. Xylol
- ◆ Rehydrieren: je 5 Min. in Ethanol absolutus I, Ethanol absolutus II, Ethanol 96%, Ethanol 80%, Ethanol 70%, Ethanol 50% und A. dest.
- ◆ 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 20 Min. 0,3%iges H₂O₂-Bad
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 30 Min. 10%iges Ziegenserum; absaugen
- ◆ 20 Std. AK I bzw. Substitutions-AK in 1:75er Verdünnung bei 4°C
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 30 Min. AK II: Vector BA-2020, 1:200er Verdünnung
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 30 Min. ABC-Lösung
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer

- ◆ 20 Min. 0,1%ige Tween 20[®]-Lösung
- ◆ Abspülen mit PBS
- ◆ 4 Min. DAB-Lösung
- ◆ 3 x 5 Min. A. dest.
- ◆ 2 Sek. gegenfärben mit Hämatoxilin
- ◆ eindecken mit Eukitt[®]: je 2 Min. Ethanol 70%, Ethanol 90%, Ethanol 96%, Ethanol absolutus I, Ethanol absolutus II, Xylol I, Xylol II.

3.2.8.5 Immunhistologischer Nachweis des EGF-Rezeptors

3.2.8.5.1 Benutzte Antiseren

- Serum: 10% Pferdeserum in PBS-Puffer
- AK I: monoklonaler Maus anti human EGF-Rezeptor, IgG1; Klon: 29,1;
Sigma [1:100]
- AK II: biotinylierter Pferd anti Maus IgG (H+L-Kette); Vector BA-2000 [1:200]
- NK: monoklonaler Maus anti Clostridium perfringens-Toxin IgG1 κ ;
Dr. Lothar Wieler, damals Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten
der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen [1:100]

3.2.8.5.2 Versuchsprotokoll

- ◆ Entparaffinieren: 2 x 10 Min. Xylol
- ◆ Rehydrieren: je 5 Min. in Ethanol absolutus I, Ethanol absolutus II, Ethanol 96%, Ethanol 80%, Ethanol 70%, Ethanol 50% und A. dest.
- ◆ 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 5 Min. Zitratpuffer
- ◆ 3 x 5 Min. in Mikrowelle kochen
- ◆ 20 Min. Abkühlung bei RT
- ◆ 20 Min. 0,3%iges H₂O₂-Bad
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 30 Min. 10%iges Pferdeserum; absaugen
- ◆ 20 Std. AK I bzw. Substitutions-AK in 1:100er Verdünnung bei 4°C
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 30 Min. AK II: Vector BA-2000, 1:200er Verdünnung
- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 30 Min. ABC-Lösung

- ◆ 3 x 5 Min. PBS-Puffer
- ◆ 20 Min. 0,1%ige Tween 20®-Lösung
- ◆ Abspülen mit PBS
- ◆ 4 Min. DAB-Lösung
- ◆ 3 x 5 Min. A. dest.
- ◆ 2 Sek. gegenfärben mit Hämatoxilin
- ◆ eindecken mit Eukitt®: je 2 Min. Ethanol 70%, Ethanol 90%, Ethanol 96%, Ethanol absolutus I, Ethanol absolutus II, Xylol I, Xylol II.

3.2.9 Auswertung

3.2.9.1 Auswahl der Präparate für die Hauptversuche

In den Vorversuchen zeigte sich, daß die Blöcke eines Tieres praktisch keine Unterschiede bezüglich des Färbemusters aufwiesen – es traten ausschließlich Unterschiede hinsichtlich der Färbeintensität und der Stärke der Hintergrundreaktion auf. Daher wurde in den Hauptversuchen jeweils nur ein Paraffinblock pro Tier eingesetzt, wobei der von der Strukturhaltung am besten geeignete Block mit der geringsten Hintergrundreaktion ausgewählt wurde.

In den Hauptversuchen wurden von 15 Plazentomen und den entsprechenden Kontrollgeweben jeweils 5 Schnitte gefärbt. Drei dieser Schnitte wurden mit dem Primärantikörper inkubiert (Positivschnitte), jeweils ein Schnitt diente zur isotypischen Kontrolle des Primärantikörpers (Isotypenkontrolle) und wurde mit Non-Immuns serum bzw. einem Substitutionsantikörper inkubiert (Substitutionsantikörper werden aus der gleichen Tierart wie der AK I gewonnen und haben die gleiche Ig-Klasse und -Subklasse, sind aber gegen ein anderes – voraussichtlich nicht im Präparat enthaltenes - Epitop gerichtet). Der fünfte Schnitt wurde zur Kontrolle des sekundären Systems – AK II und ABC-Komplex - nur mit PBS-Puffer an Stelle von AK I inkubiert (PBS-Negativkontrolle).

Von den drei Positivschnitten wurde in die Auswertung jeweils nur ein Schnitt in der Auswertung beurteilt; dabei wurde der von seiner Histologie/Morphologie am besten erhaltene Schnitt ausgewählt.

3.2.9.2 Auswertung der immunhistologisch gefärbten Gewebeschnitte im Hauptversuch

3.2.9.2.1 Auswertungsschema

Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte rein deskriptiv. Von den histologischen Schnitten der einzelnen Plazentome wurden jeweils einander entsprechende Gesichtsfelder im Mikroskop eingestellt und mit Hilfe einer Mikroskop-Computeranlage direkt als Bild-Datei abgespeichert. Die Auswertung dieser Bilddateien erfolgte nach folgendem Schema:

Von allen 15 Rinderplazentomen wurden pro Hauptversuch jeweils ein Positivschnitt, ein Isotypenkontrollschnitt und eine PBS-Negativkontrolle beurteilt (siehe Kapitel: 3.2.9.1, Seite 67). Die Positivschnitte wurden in drei Zonen eingeteilt:

- ◆ Karunkelstielnähe
- ◆ Mitte
- ◆ Chorionnähe

In diesen Schnitten wurden entlang einer gedachten Geraden vom Karunkelstiel zum Chorion insgesamt neun Gesichtsfelder – d.h.: jeweils drei Gesichtsfelder pro Zone – ausgewählt und mit Hilfe eines Video-Capture-Programmes als Bilddatei im Computer gespeichert. Dabei wurde in jeder Zone jeweils ein auf der Gerade liegendes Gesichtsfeld im 20er Objektiv und je ein links und rechts unterhalb des ersten Feldes liegendes Gesichtsfeld im 40er Objektiv eingestellt (siehe Abbildung 4: Darstellung der ausgewerteten Gesichtsfelder).

Da die Negativkontrollen in allen Zonen einheitlich reagierten, wurden von ihnen jeweils nur in einer Zone (Mitte) insgesamt drei Bilder aufgenommen, wobei auch hier ein Gesichtsfeld im 20er Objektiv und je ein links und rechts unterhalb des ersten Feldes liegendes Gesichtsfeld im 40er Objektiv eingestellt wurde.

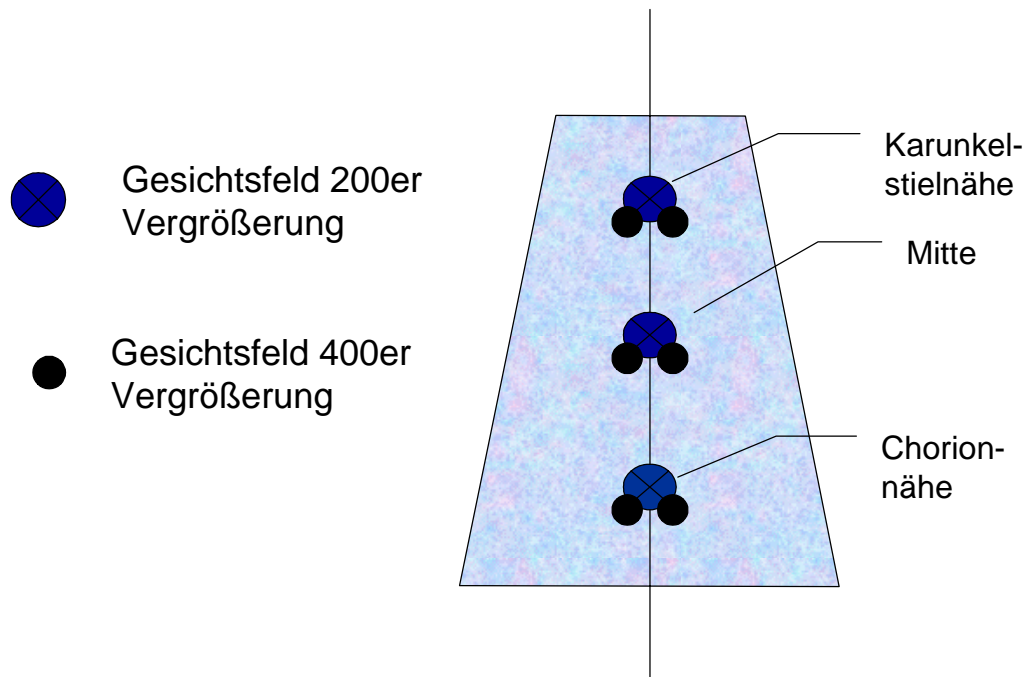


Abbildung 4: Darstellung der ausgewerteten Gesichtsfelder

Die Auswertung der zu einem bestimmten AK gehörenden Bilddateien erfolgte erst nach Speicherung aller auszuwertender Bilder. Um die subjektiven Beurteilungseinflüsse möglichst gering zu halten, wurden alle Bilder eines Hauptversuches nacheinander beurteilt. Dabei wurden nur die erforderlichen Arbeitspausen eingehalten. In diesen Pausen wurden keine anderen histologischen Präparate beurteilt. In jeder Bilddatei wurde die Färbereaktion in den vier Zellpopulationen der Plazentome (maternales Stroma, Karunkel-epithel, fetales Stroma, Trophoblast) einzeln beurteilt und die getroffenen Wertungen in tabellarischer Form für jedes Tier getrennt dokumentiert. Dabei wurden unspezifische Hintergrundreaktionen der Isotypenkontrollen in die Beurteilung der Positivschnitte mit einbezogen. Das heißt, daß bei Schnitten mit Hintergrundreaktionen die Intensität der Farbreaktion der entsprechenden Strukturen im Positivschnitt nach Abzug der unspezifischen Reaktion bewertet wurden. Nach Auswertung der einzelnen Bilddateien wurden die erfaßten Färbereaktionen der drei Bilder einer Zone tabellarisch zusammengefaßt. Weiterführend wurden die Färbereaktionen eines Schnittes und anschließend die Ergebnisse aller Tiere eines Trächtigkeitsstadiums bzw. der Geburtstiere zusammengefaßt. Im Ergebnisteil sind für jeden Hauptversuch die Ergebnisse der immunhistologischen Auswertung aller Tiere eines Trächtigkeitsstadiums und der Geburtstiere zusammengefaßt (Zusammenfassung der Ergebnisse); im Anhang finden sich die Tabellen mit der Darstellung der

Färbeergebnisse jedes einzelnen Tieres (Zusammenfassung der Ergebnisse der Tiere).

Zusätzlich findet sich im Ergebnisteil eine semiquantitative Erfassung der immunhistologischen Reaktion in Tabellenform, wobei auch hier die verschiedenen Zellpopulationen (maternales Stroma, Karunkelepithel, fetales Stroma, Trophoblast) einzeln betrachtet und jeweils die Signalintensität und die Anzahl der betroffenen Zellen beurteilt wurden. Der Signalintensität wurde ein Index von Null (= negativ) bis +++ (= intensiv positiv) zugeordnet, während der Anzahl der betroffenen Zellen ein Index von Null (= keine Zelle) bis +++++ (= alle Zellen) zugeordnet wurde.

3.2.9.3 Aufnahme der Bilder

Die Histologie wurde mit einem Leiz DMR Mikroskop (Firma Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, D-35530 Wetzlar) betrachtet und mit einer JVC Colour Video Kamera, Typ TK-1070E, RGB (JVC, Professional Products GmbH) aufgenommen. Als Software für das Einfangen und Speichern der Bilddateien wurde beim Nachweis von bFGF-Faktor, Verfahren 1 unter Verwendung des monoklonalen AK (monoklonaler Maus anti Rinder bFGF-Faktor IgG1κ) der AV-Master, FastCapVersion 2.2.0, Copyright® 1996, FAST Multimedia Inc. benutzt.

Bei allen anderen Versuchen wurden die Bilddateien mit Hilfe einer WinTV PCI-Graphikkarte, Model 416 und dem dazu gehörenden Snap-Programm eingefangen und als JPEG-Datei abgespeichert.

4 Ergebnisse

4.1 *Immunhistologischer Nachweis der Wachstumsfaktoren*

4.1.1 Nachweis von aFGF

Wie aus Tabelle 1 und Tabelle 2 (siehe auch Anhang: Tabelle 11) hervorgeht, trat aFGF unabhängig vom Trächtigkeitsstadium in allen untersuchten Plazentaprobe mit einem qualitativ weitgehend gleichbleibenden Reaktionsmuster auf: Sowohl fetales (siehe Abbildung 8: weiße Pfeile) als auch maternales (siehe Abbildung 5: schwarze Pfeile) Stroma zeigten schwache bis intensive Färbungen der Kerne in nahezu allen Stromazellen, wobei eine eindeutige Differenzierung in Endothelzellen, Myozyten, Perizyten und Fibrozyten bzw. Fibroblasten in den Schnitten nicht möglich war. Das Karunkel epithel wies in Zytosol und Kern ein von schwach bis intensiv variierendes Signal aller Zellen auf (siehe Abbildung 5 und Abbildung 7: schwarze Pfeilspitzen); nur vereinzelt traten negative Kerne auf (siehe Abbildung 7: offene Pfeilspitze). Im Trophoblasten waren ebenfalls nahezu alle Zellen positiv, wobei die großen BNC in Kern und Zytosol positiv reagierten (siehe Abbildung 5 und Abbildung 8: kleine weiße Pfeilspitze), während die kleinen BNC durch ihren teilweise blassen Kern bei intensiver zytosolischer Reaktion auffielen (siehe Abbildung 5 und Abbildung 6: große weiße Pfeilspitzen). Der Tendenz nach ergaben sich für Tag 220 in allen Zellpopulationen schwächere Signale als zu den anderen untersuchten Zeitpunkten.

Unter der Geburt (siehe Abbildung 8) waren keine wesentlichen Veränderungen des Reaktionsmusters zu erkennen. Fetales und maternales Stroma zeigten die von schwach bis intensiv variierende nukleäre Färbung in nahezu allen Zellen; auch im Trophoblasten reagierten alle Zellen positiv, wobei hier tendenziell in den großen BNC die nukleäre Färbung dominierte, während bei den kleinen BNC nukleäre und zytosolische Färbung ausgeglichen waren. Das maternale Karunkel epithel war nicht mehr eindeutig abgrenzbar und daher nicht zu beurteilen.

Abbildung 5 bis Abbildung 9:

Nachweis von aFGF mit Hämatoxilin-Gegenfärbung (Vergrößerung: 440x):

Fetale Gewebe werden mit weißen, maternale Gewebe mit schwarzen Symbolen gekennzeichnet, wobei Stromazellen mit Pfeilen und Epithelzellen mit Pfeilspitzen markiert werden:

weiße Pfeile = fetale Stromazellen

weiße Pfeilspitze = Trophoblastzellen: kleine Pfeilspitze \Rightarrow große BNC
große Pfeilspitze \Rightarrow kleine BNC

schwarze Pfeile = maternale Stromazellen

schwarze Pfeilspitze = Karunkel epithel: offene Pfeilspitze \Rightarrow zytosol. Reaktion
geschlossene Pfeilspitze \Rightarrow zytosol. und nukleäre Reaktion

4.1.1.1 Darstellung der histologischen Präparate mit immunhistologischem Nachweis von aFGF

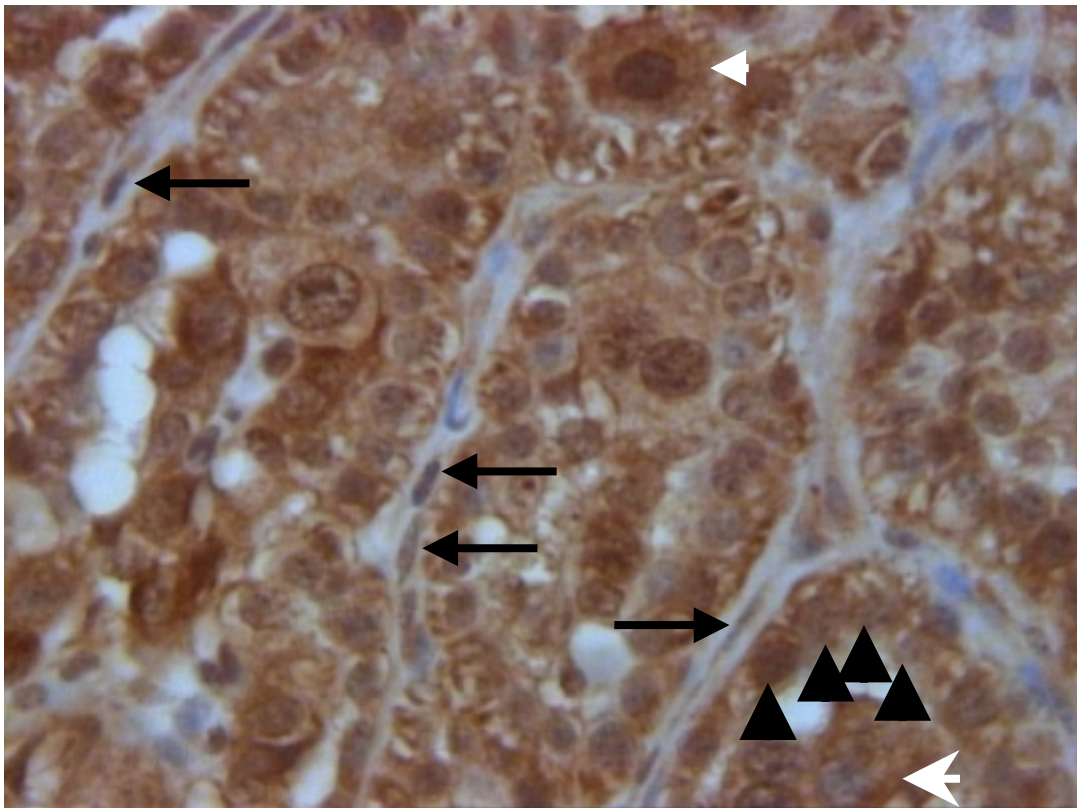


Abbildung 5: Tag 150, Rd 21, aFGF

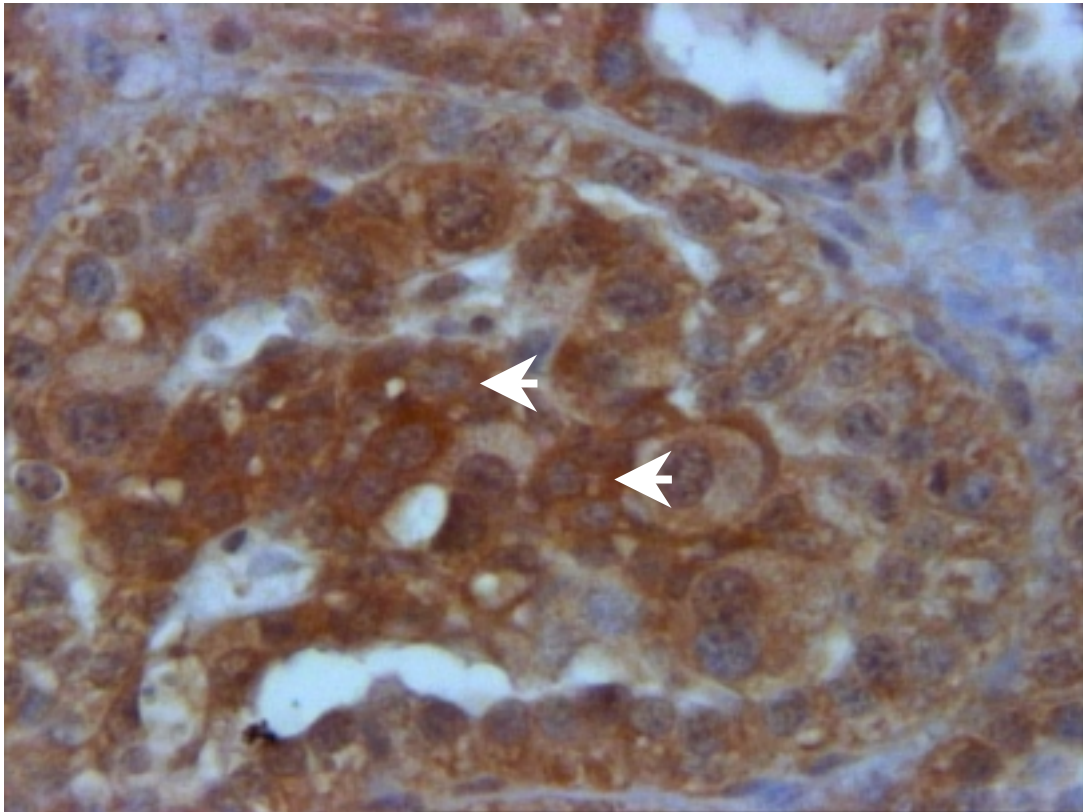


Abbildung 6: Tag 150, Rd 22; aFGF

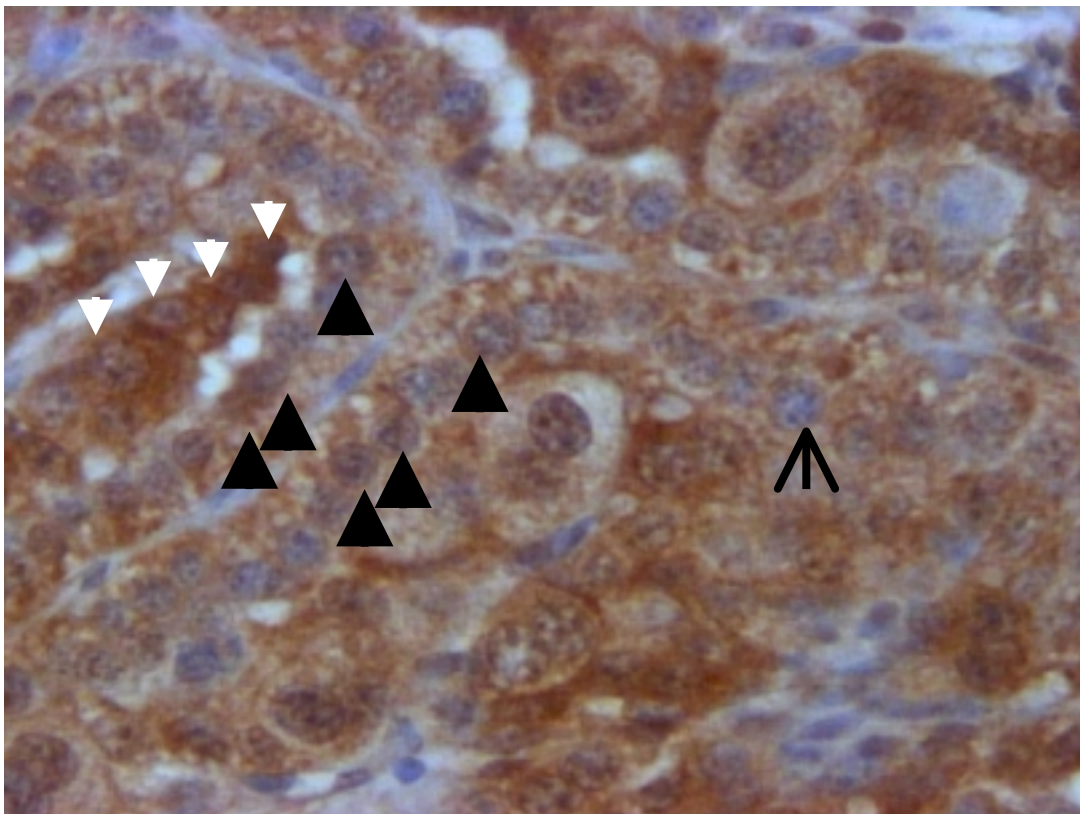


Abbildung 7: Geburt, G 2; aFGF

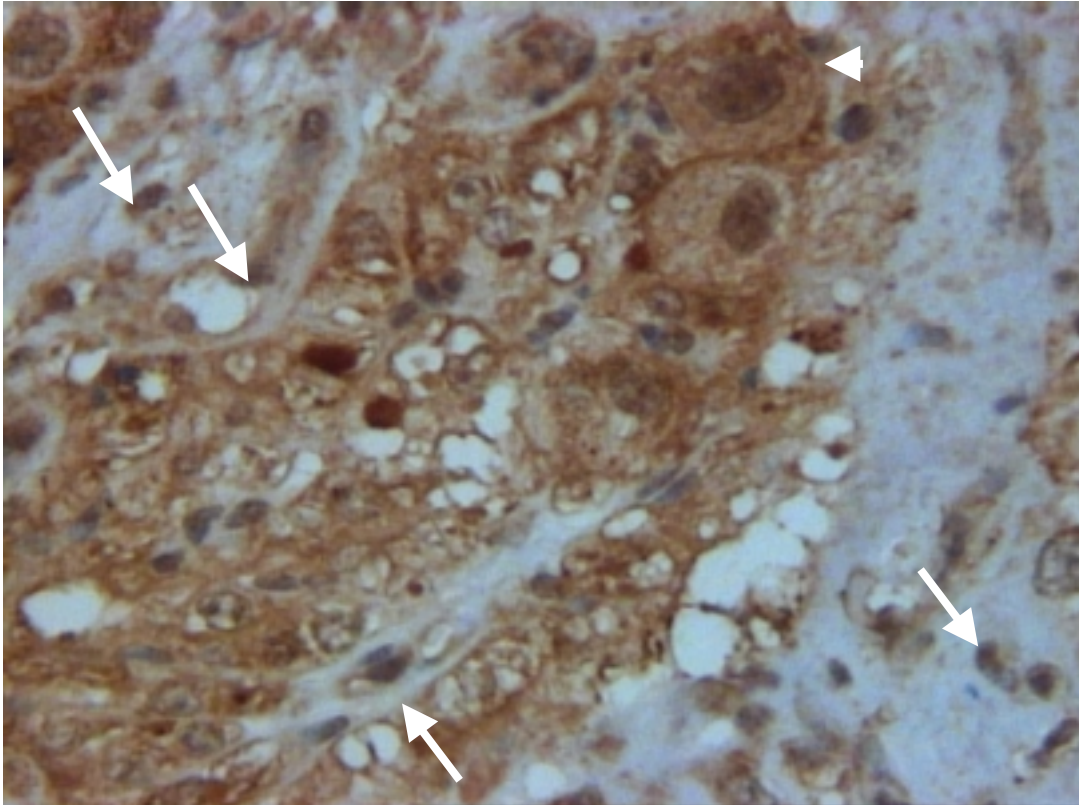


Abbildung 8: Geburt, G2; aFGF

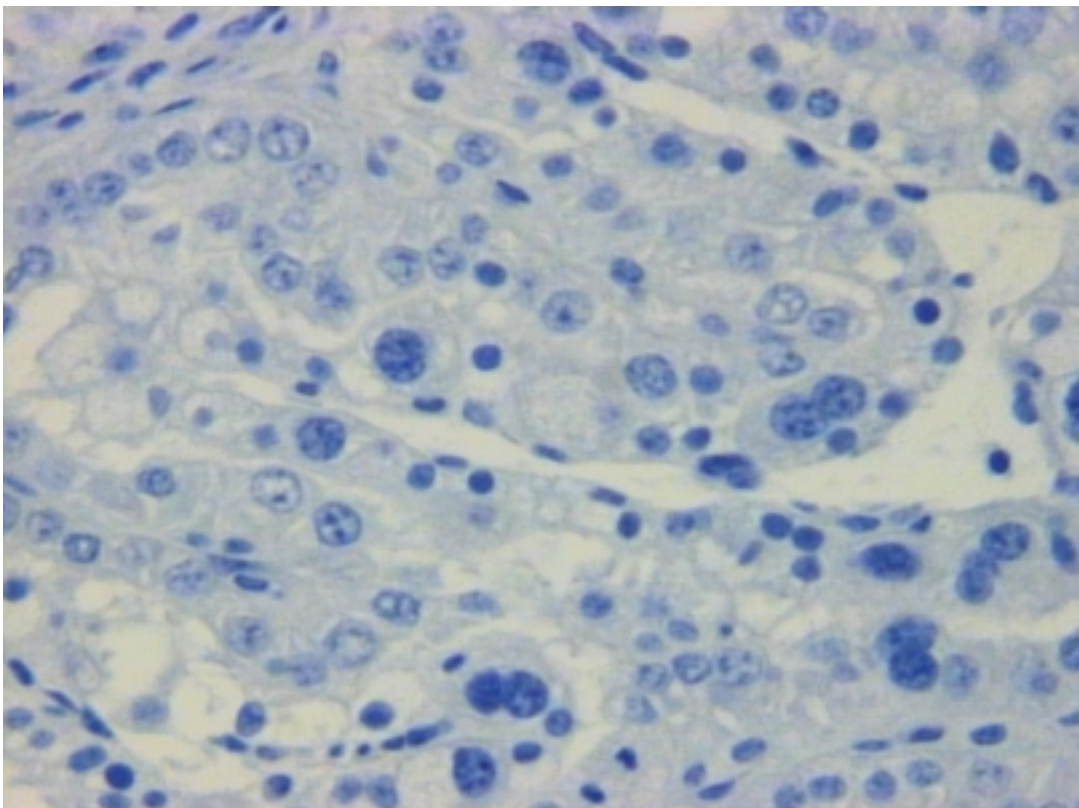


Abbildung 9: Negativkontrolle zu aFGF

**Tabelle 1: Ergebnisse des immunhistologischen Nachweises von aFGF;
Zusammenfassung der Ergebnisse nach Trächtigkeitsstadien**

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel- epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 150	Rd 21 Rd 22 Rd 23	004-012 100-108 112-120	schwaches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen genaue Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Zellen überlappend mit deutlichem bis intensivem zytosolischen Signal in nahezu allen Zellen	schwaches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen genaue Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Zellen, überlappend mit schwachem bis intensivem zytosolischen Signal in nahezu allen Zellen
Tag 220	Rd 14 Rd 15 Kuh 3	016-024 124-132 136-144	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen genaue Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Zellen, überlappend mit schwachem bis deutlichem zytosolischen Signal in nahezu allen Zellen	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen genaue Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Zellen, überlappend mit schwachem bis intensivem zytosolischen Signal in nahezu allen Zellen
Tag 240	Rd 16 Rd 19 Rd 20	028-036 148-156 160-168	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Stromazellen genaue Zelldifferenzierung nicht immer möglich	deutliches bis intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig deutliches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Stromazellen genaue Zelldifferenzierung nicht immer möglich	deutliches bis intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig schwaches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel- epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 270	Rd 17 Rd 18 Rd 24	040-048 052-060 172-180	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Stromazellen genaue Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig schwaches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen	schwaches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen genaue Zelldifferenzierung nicht immer möglich	deutliches bis intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig schwaches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen
Geburt	G 2 G 3 G 4	64-72 76-84 88-96	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Stromazellen genaue Zelldifferenzierung nicht immer möglich	nicht mehr eindeutig abgrenzbar	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Stromazellen genaue Zelldifferenzierung nicht immer möglich	deutliches bis intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in allen Zellen

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse des immunhistologischen Nachweises von aFGF; Differenzierung nach Signalintensität (neg. = 0; sehr schwach positiv = +); schwach positiv = ++; deutlich positiv = +++; intensiv positiv = ++++) und Anzahl der betroffenen Zellen (keine = 0; einzelne Z. = +; einige Z. = ++; viele Z. = +++; nahezu alle Z. = ++++; alle Z. = +++++).
 Uni = Uninukleäre; nuk. = nukleäre Färbung, zyt. = zytosolische Färbung, n. b. = nicht beurteilbar, SI = Signalintensität, ZA = Zellanzahl

Grav.- stadium und Tier	Auswertung								Mess- para- meter
	maternales Stroma		Karunkel- epithel		fetales Stroma		Trophoblast		
Tag 150 Rd 21 Rd 22 Rd 23	nuk.	+/+++	nuk.	+/+++	nuk.	+/+++	nuk.	+/+++	SI
		+++		++++		+++		++++	ZA
	zyt.	0	zyt.	++/+++	zyt.	0	zyt.	+/+++	SI
		0		+++		0		+++	ZA
	Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				
Tag 220 Rd 14 Rd 15 Kuh 3	nuk.	+/+++	nuk.	+/+++	nuk.	+/+++	nuk.	+/+++	SI
		++		++++		++		++++	ZA
	zyt.	0	zyt.	+/++	zyt.	0	zyt.	+/+++	SI
		0		++++		0		++++	ZA
	Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				
Tag 240 Rd 16 Rd 19 Rd 20	nuk.	+/+++	nuk.	++/+++	nuk.	+/+++	nuk.	++/ +++	SI
		++++		+++++		++++		++++ +	ZA
	zyt.	0	zyt.	++/+++	zyt.	0	zyt.	+/+++	SI
		0		+++++		0		++++ +	ZA
	Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				
Tag 270 Rd 17 Rd 18 Rd 24	nuk.	+/+++	nuk.	+/+++	nuk.	+/+++	nuk.	++/ +++	SI
		++++		+++++		+++		++++ +	ZA
	zyt.	0	zyt.	+/+++	zyt.	0	zyt.	+/+++	SI
		0		+++++		0		++++ +	ZA
	Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				

Grav.- stadium und Tier	Auswertung								Mess- para- meter
	maternales Stroma		Karunkel- epithel		fetales Stroma		Trophoblast		
Geburt	nuk.	+/+++	nuk.	n.b.	nuk.	+/+++	nuk.	++/ +++	SI
G 2		++++		n.b.		++++		+++++	ZA
G 3	zyt.	0	zyt.	n.b.	zyt.	0	zyt.	+ / ++	SI
G 4		0		n.b.		0		+++++	ZA
	Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				

4.1.2 Nachweis von bFGF

4.1.2.1 Verfahren 1 unter Verwendung des monoklonalen AK (Maus anti Rinder bFGF IgG1 κ)

Bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers (siehe: Tabelle 3, Tabelle 4 und Anhang: Tabelle 12) zeigten sich im maternalen (siehe Abbildung 10, Abbildung 12, Abbildung 18: schwarze Pfeile) und fetalen Stroma (siehe Abbildung 16: weißer Pfeil) in allen Trächtigkeitsstadien an einigen Stromazellen schwache bis intensive nukleäre Signale - teilweise auch mit perinukleärer bzw. zytosolischer Beteiligung, wobei eine eindeutige Differenzierung von Endothelzellen nur vereinzelt im fetalen Stroma (siehe Tabelle 3: Tag 240, Geburt) möglich war. Die Reaktion war im fetalen Stroma schwächer als im maternalen Stroma. Unter der Geburt war im maternalen Stroma die Anzahl der deutlich bis intensiv positiv reagierenden Zellkerne höher als die Anzahl der schwach positiv reagierenden Zellkerne (siehe Abbildung 18: schwarze Pfeile), während im fetalen Stroma nur vereinzelt intensive nukleäre Signale auftraten. Im Karunkel epithel reagierte ausschließlich das Zytosol, welches ein schwaches bis deutliches Signal aufwies (siehe Abbildung 10, Abbildung 14: schwarze Pfeilspitzen). Dieses Signal war an den Tagen 150 und 240 in allen Zellen, am Tag 270 in vielen Zellen, am Tag 220 nur in einzelnen Zellen zu sehen; unter der Geburt war das Karunkel epithel nicht mehr abgrenzbar. Soweit erkennbar (siehe Abbildung 14: kleine weiße Pfeilspitzen) waren alle in das Karunkel epithel eingewanderten BNC negativ. Auch im Trophoblasten traten nur zytosolische Signale auf, wobei die großen BNC jeweils negativ waren (siehe Abbildung 10: kleine weiße Pfeilspitzen). Die Ausdehnung und die Intensität des granulierten zytosolischen Signales der Uninukleären und des zytosolischen Signales der kleinen BNC (siehe Abbildung 14, Abbildung 16: große weiße Pfeilspitzen) nahmen von Tag 150 bis Tag 270 deutlich ab, wobei am Tag 220 die Reaktionsintensität insgesamt deutlich herabgesetzt war (siehe Abbildung 12: weiße Pfeilspitzen). Unter der Geburt ergaben sich für das Trophoblastgewebe keine Unterschiede zur Negativkontrolle.

Tendenziell war in allen Zellpopulationen ein Rückgang der Reaktionsintensität vom Tag 150 bis Tag 270 zu erkennen, wobei am Tag 220 sowohl die Ausdehnung als auch die Intensität der Farbreaktion deutlich vermindert waren (siehe Abbildung 12). Unter der Geburt färbten sich nur noch die Stromaanteile des Plazentoms, wobei im

maternalen Stroma viele Zellen positiv nukleär (siehe Abbildung 18: schwarze Pfeile), im fetalem Stroma nur einzelne Endothelzellkerne positiv reagierten.

Tabelle 3: Ergebnisse des immunhistologischen Nachweises von bFGF, Verfahren 1 mit mAK; Zusammenfassung der Ergebnisse nach Trächtigkeitsstadien

Grav.-stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel-epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 150	Rd 21 Rd 22 Rd 23	01-09 46-54 55-63	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	granuliertes sehr schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in allen Zellen	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	granuliertes schwaches bis intensives zytosolisches Signal in nahezu allen Uninukleären, deutliches bis intensives zytosolisches Signal in allen kleinen BNC, große BNC negativ
Tag 220	Rd 14 Rd 15 Kuh 3	10-18 64-72 73-81	sehr schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen, teilweise tritt auch perinukleäres/zytosolisches Signal auf genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	granuliertes sehr schwaches zytosolisches Signal in einzelnen Zellen	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einzelnen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	in einigen Regionen granuliertes schwaches bis intensives zytosolisches Signal in einigen Uninukleären, sehr schwaches bis intensives zytosolisches Signal in einigen kleinen BNC, große BNC negativ

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel- epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 240	Rd 16 Rd 19 Rd 20	19-027 82-093 97-104	sehr schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen intensives nukleäres Signal tritt bevorzugt an Septenspitze und in Mitte auf genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	granuliertes schwaches bis deutliches zytosoli- sches Signal in allen Zellen, eingewand erte BNC negativ	intensives nukleäres Signal in einzelnen Endothelzellen	granuliertes schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in vielen Uninukleären, intensives zytosolisches Signal in vielen kleinen BNC, große BNC negativ
Tag 270	Rd 17 Rd 18 Rd 24	028-036 109-117 118-126	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	granuliertes schwaches bis deutliches zytosoli- sches Signal in vielen Zellen	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einzelnen Stromazellen, teilweise tritt auch perinukleäres/ zytosolisches Signal auf genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	granuliertes schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in einigen Uninukleären, deutliches bis intensives zytosolisches Signal in einigen kleinen BNC, große BNC negativ
Geburt	G 2 G 3 G 4	130-138 139-147 037-045	schwaches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	nicht mehr abgrenzbar	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einzelnen Endothelzellen	kaum auswertbar, alle Signale treten auch in Negativ- kontrolle auf, daher als NEGATIV beurteilt

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse des immunhistologischen Nachweises von bFGF, Verfahren 1 mit mAK, Differenzierung nach Signalintensität (neg. = 0; sehr schwach positiv = (+); schwach positiv = +; deutlich positiv = ++; intensiv positiv = +++) und Anzahl der betroffenen Zellen (keine = 0; einzelne Z. = +; einige Z. = ++; viele Z. = +++; nahezu alle Z. = ++++; alle Z. = +++++). Uni = Uninukleäre; nuk. = nukleäre Färbung, zyt. = zytosolische Färbung, n. b. = nicht beurteilbar, SI = Signalintensität, ZA = Zellanzahl

Grav.- stadium und Tier	Auswertung									Mess- para- meter
	maternales Stroma		Karunkel- epithel		fetales Stroma		Trophoblast			
Tag 150	nuk.	+ / +++	nuk.	0	nuk.	+ / ++	nuk.	Uni	kleine BNC	
Rd 21		++		0		++		0	0	
Rd 22										
Rd 23	zyt.	0	zyt.	(+) / ++	zyt.	0	zyt.	+ / +++	++ / ++ +	SI
		0		+++++		0		++++	+++++	ZA
	Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich					
Tag 220	nuk.	(+) / +++	nuk.	0	nuk.	+ / ++	nuk.	Uni	kleine BNC	
Rd 14		++		0		+		0	0	
Rd 15										
Kuh 3	zyt.	(+)	zyt.	(+)	zyt.	0	zyt.	+ / +++	(+) / +++	SI
		+ / ++		+		0		++	++	ZA
	Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich					
Tag 240	nuk.	(+) / +++	nuk.	0	nuk.	+++	nuk.	Uni	kleine BNC	
Rd 16		++		0		+		0	0	
Rd 19										
Rd 20	zyt.	0	zyt.	+ / ++	zyt.	0	zyt.	+ / ++	+++	SI
		0		+++++		0		+++	+++	ZA
	intensive Signale bes. Septenspitze Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich		eingewan- derte BNC sind negativ		Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich					

Grav.- stadium und Tier	Auswertung									Mess- para- meter
	maternales Stroma		Karunkel- epithel		fetales Stroma		Trophoblast			
Tag 270 Rd 17 Rd 18 Rd 24	nuk.	+/+++	nuk.	0	nuk.	+/+++	nuk.	Uni	kleine BNC	
		++		0		+		0	0	
	zyt.	0	zyt.	+/++	zyt.	(+)/++	zyt.	+/++	++/++ +	SI
		0		+++		(+)		++	++	
	Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich					
Geburt G 2 G 3 G 4	nuk.	+/+++	nuk.	n.b.	nuk.	+/+++	Da alle Signale auch in Negativkontrolle auftreten, wurde hier als NEGATIV beurteilt			
		+++		n.b.		+				
	zyt.	0	zyt.	n.b.	zyt.	0				
		0		n.b.		0				
	Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				nur Endothel- zellen betroffen					

4.1.2.2 Verfahren 2 unter Verwendung des polyklonalen AK (Kaninchen anti Rinder bFGF-Faktor)

Anders als bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers ergaben sich bei Verwendung des polyklonalen Antikörpers (siehe: Tabelle 5, Tabelle 6; Anhang: Tabelle 13) nukleäre Signale im Karunkelepithel und Trophoblasten. Die maternalen Stromazellen (siehe Abbildung 11, Abbildung 13, Abbildung 17: schwarze Pfeile) zeigten schwache bis intensive nukleäre Signale, wobei am Tag 150 und unter der Geburt viele Zellen, an den Tagen 220, 240 und 270 dagegen nur einige Zellen betroffen waren. Ähnlich reagierte das fetale Stroma von der Intensität her (siehe Abbildung 11, Abbildung 19: weiße Pfeile); bezogen auf die Zahl reagierender Zellen war hier die Reaktion jedoch etwas schwächer ausgeprägt als im maternalen Anteil (siehe Tabelle 5, Tabelle 6: Tag 150, 240, 270, Geburt). Im Karunkelepithel ließen sich in allen Trächtigkeitsstadien nukleäre Signale erkennen, die an den Tagen 150 und 220 nur schwach waren und an den Tagen 240 und 270 von schwach bis intensiv variierten (siehe Abbildung 11, Abbildung 15: geschlossene schwarze Pfeilspitzen). Daneben zeigten sich in einigen Zellen an den Tagen 150, 240 und 270 schwache bis deutliche zytosolische Signale (siehe Abbildung 15: offene schwarze Pfeilspitzen). Im Trophoblasten wiesen in allen untersuchten Stadien einige/einzelne BNC schwache bis intensive nukleäre Signale auf (siehe Abbildung 11: weiße Pfeilspitze), wobei am Tag 150 zusätzlich auch die uninukleären Zellen dieses Signal aufwiesen. Gleichzeitig war in allen Trächtigkeitsstadien ein schwaches bis deutliches zytosolisches Signal einiger Trophoblastzellen (BNC und Uninukleäre) vorhanden (siehe Abbildung 15 und Abbildung 17: weiße Pfeilspitzen), welches z.T. überlappend mit der nukleären Reaktion, unter der Geburt aber nur noch vereinzelt auftrat.

Auch bei Verwendung des polyklonalen Antikörpers fiel am Tag 220 die Reduktion der Signalintensität auf (in Abbildung 13 leider nicht deutlich erkennbar!). Auffallend war weiter, daß unter der Geburt die Reaktionen weitestgehend auf das Stroma beschränkt waren und nur noch vereinzelt epitheliale Zellen (erhaltene BNC) positiv reagierten (siehe Abbildung 19: weiße Pfeilspitzen).

Tabelle 5: Ergebnisse des immunhistologischen Nachweises von bFGF, Verfahren 2 mit pAK; Zusammenfassung der Ergebnisse nach Trächtigkeitsstadien

Grav.-stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel-epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 150	Rd 21 Rd 22 Rd 23	01-09 73-81 61-69	schwaches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches nukleäres Signal in einigen Zellen, teilweise überlappend schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in einigen Zellen	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen BNC und einigen Uninukleären, schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in einigen Trophoblastzellen (BNC und Uninukleäre gleichermaßen)
Tag 220	Rd 14 Rd 15 Kuh 3	016-024 088-096 100-108	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches nukleäres Signal in einzelnen Zellen	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen BNC, teilweise überlappend schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in einzelnen Trophoblastzellen (BNC und Uninukleäre gleichermaßen)
Tag 240	Rd 16 Rd 19 Rd 20	028-036 136-144 160-168	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einigen Zellen, teilweise überlappend schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in einigen Zellen	schwaches nukleäres Signal in einzelnen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einzelnen BNC, teilweise überlappend schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in einigen Trophoblastzellen (BNC und Uninukleäre gleichermaßen)

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel- epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 270	Rd 17 Rd 18 Rd 24	037-045 148-156 172-180	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Zellen, teilweise überlappend schwaches zytosolisches Signal in einzelnen Zellen	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einzelnen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einzelnen BNC, teilweise überlappend schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in einigen Trophoblastzellen (BNC und Uninukleäre gleichermaßen)
Geburt	G 2 G 4 G 5	112-120 124-132 049-057	deutliches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	nicht mehr abgrenzbar	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives nukleäres Signal in erhaltenen BNC, teilweise überlappend schwaches zytosolisches Signal in einzelnen Trophoblastzellen (BNC und Uninukleäre gleichermaßen)

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse des immunhistologischen Nachweises von bFGF, Verfahren 2 mit pAK, Differenzierung nach Signalintensität (neg. = 0; schwach positiv = +; deutlich positiv = ++; intensiv positiv = +++) und Anzahl der betroffenen Zellen (keine = 0; einzelne Z. = +; einige Z. = ++; viele Z. = ++++; nahezu alle Z. = +++++; alle Z. = ++++++).
 Uni = Uninukleäre; nuk. = nukleäre Färbung, zyt. = zytosolische Färbung, n. b. = nicht beurteilbar, SI = Signalintensität, ZA = Zellanzahl

Grav.- stadium und Tier	Auswertung								Mess- para- meter
	maternales Stroma		Karunkel- epithel		fetales Stroma		Trophoblast		
Tag 150	nuk.	+ / +++	nuk.	+	nuk.	+ / +++	nuk.	+ / +++	SI
Rd 21 Rd 22 Rd 23		+++		++		++		++ BNC+Uni	ZA
	zyt.	0	zyt.	+ / ++	zyt.	0	zyt.	+ / ++	SI
		0		++		0		++ BNC+Uni	ZA
	Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				
Tag 220	nuk.	+ / +++	nuk.	+	nuk.	+ / ++	nuk.	+ / +++	SI
Rd 14 Rd 15 Kuh 3		++		+		++		++ BNC	ZA
	zyt.	0	zyt.	0	zyt.	0	zyt.	+ / ++	SI
		0		0		0		+ BNC+Uni	ZA
	Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				
Tag 240	nuk.	+ / +++	nuk.	+ / ++	nuk.	+	nuk.	+ / +++	SI
Rd 16 Rd 19 Rd 20		++		++		+		+ BNC	ZA
	zyt.	0	zyt.	+ / ++	zyt.	0	zyt.	+ / ++	SI
		0		++		0		+ BNC+Uni	ZA
	Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				

Grav.- stadium und Tier	Auswertung								Mess- para- meter
	maternales Stroma		Karunkel- epithel		fetales Stroma		Trophoblast		
Tag 270	nuk.	+/+++	nuk.	+/+++	nuk.	+/+++	nuk.	+/+++	SI
Rd 17 Rd 18 Rd 24		++		++		+		+ BNC	ZA
	zyt.	0	zyt.	+	zyt.	0	zyt.	+/++	SI
		0		+		0		++ BNC+Uni	ZA
		Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich			
Geburt	nuk.	++/+++	nuk.	n.b.	nuk.	+/+++	nuk.	+/+++	SI
G 2 G 4 G 5		+++		n.b.		++		erhaltene BNC	ZA
	zyt.	0	zyt.	n.b.	zyt.	0	zyt.	+	SI
		0		n.b.		0		+ BNC+Uni	ZA
		Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich				Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich			

Abbildung 10 bis Abbildung 19:

Immunhistologischer Nachweis von bFGF, Verfahren 1 (mAK) und Verfahren 2 (pAK),
Hämatoxylin-Gegenfärbung (Vergrößerung: 400x):

Fetale Gewebe werden mit weißen, maternale Gewebe mit schwarzen Symbolen
gekennzeichnet, wobei Stromazellen mit Pfeilen und Epithelzellen mit Pfeilspitzen markiert
werden:

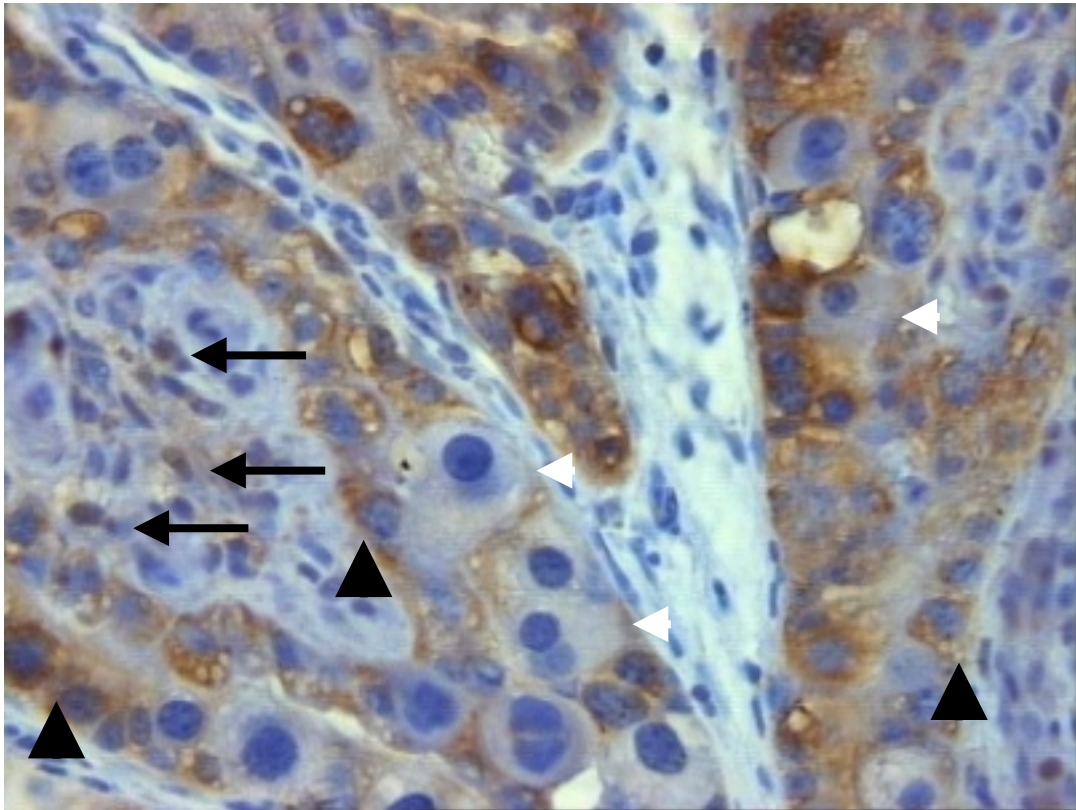
weiße Pfeile = fetales Stroma

weiße Pfeilspitze = Trophoblast (bei mAK Unterscheidung von
kleinen Pfeilspitzen = große BNC
große Pfeilspitzen = kleine BNC)

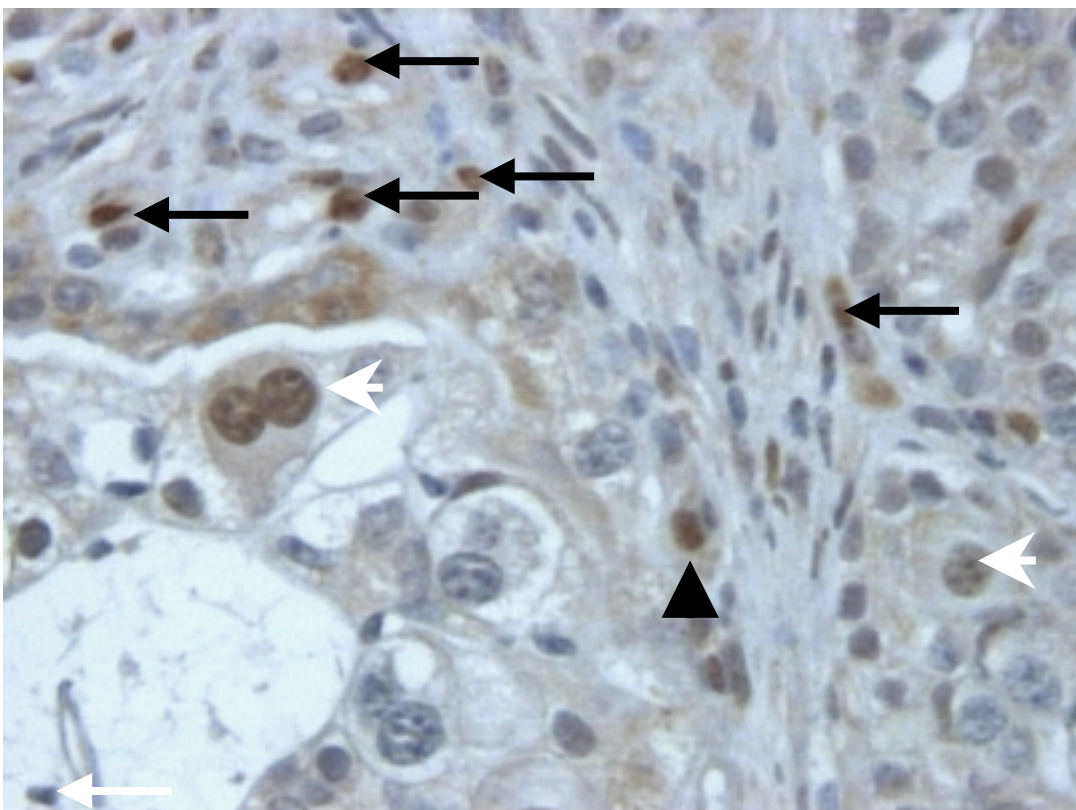
schwarze Pfeile = maternales Stroma

schwarze Pfeilspitze = Karunkel-epithel (bei pAK offene Spitzen = zytosol. Reaktion)

4.1.2.2.1 Vergleichende Darstellung der histologischen Präparate nach immunhistologischem Nachweis von bFGF mit Verfahren 1 (mAK) und Verfahren 2 (pAK):



Abbildungung 10: bFGF, mAK; Tag 150, Rd 21



Abbildungung 11: bFGF, pAK; Tag 150, Rd 21

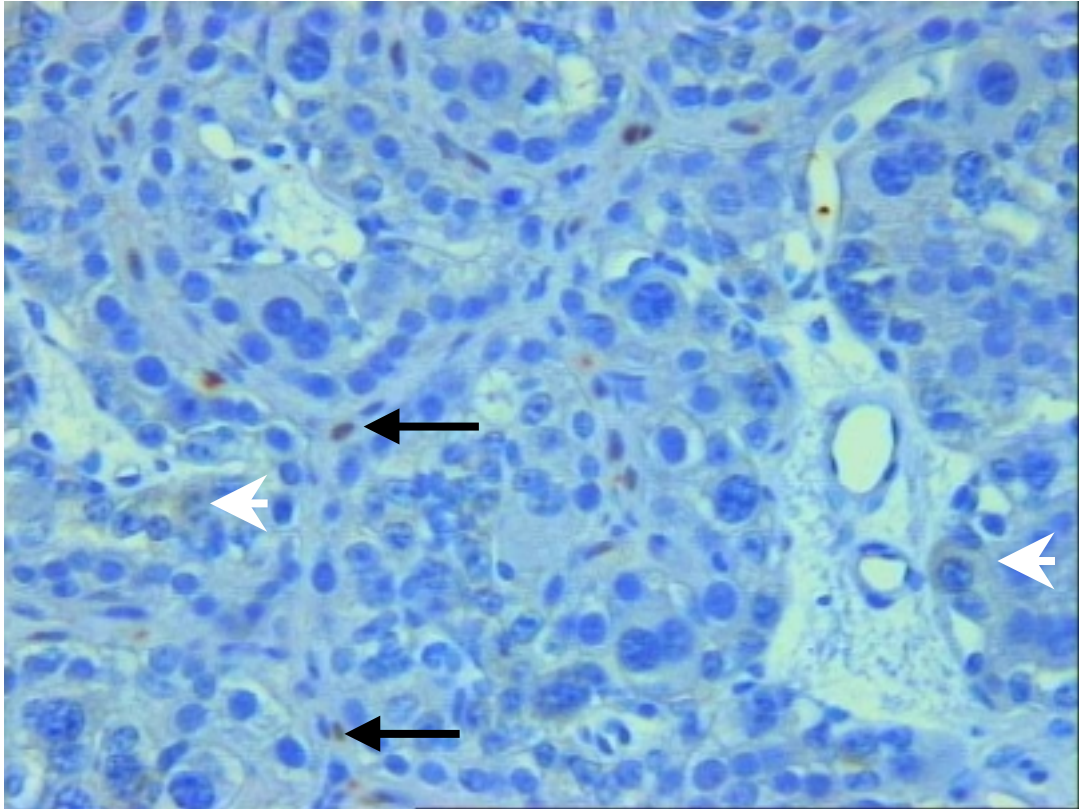


Abbildung 12: bFGF, mAK; Tag 220, Rd 14

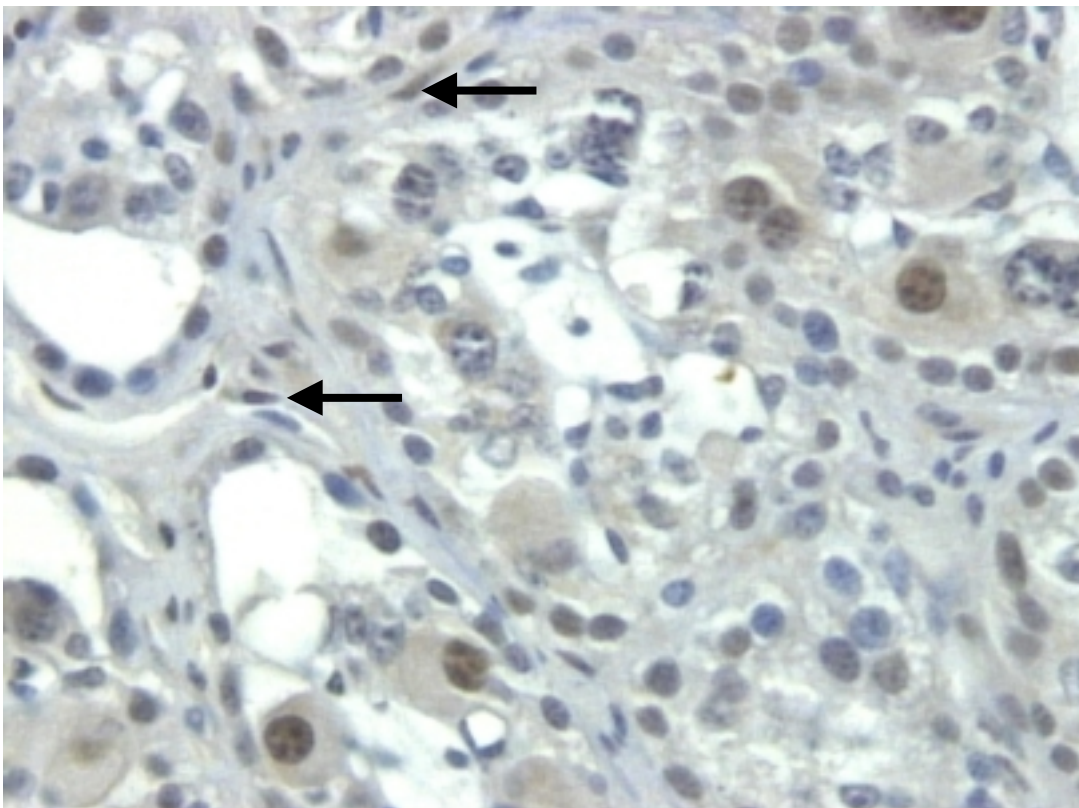


Abbildung 13: bFGF, pAK; Tag 220, Rd 14

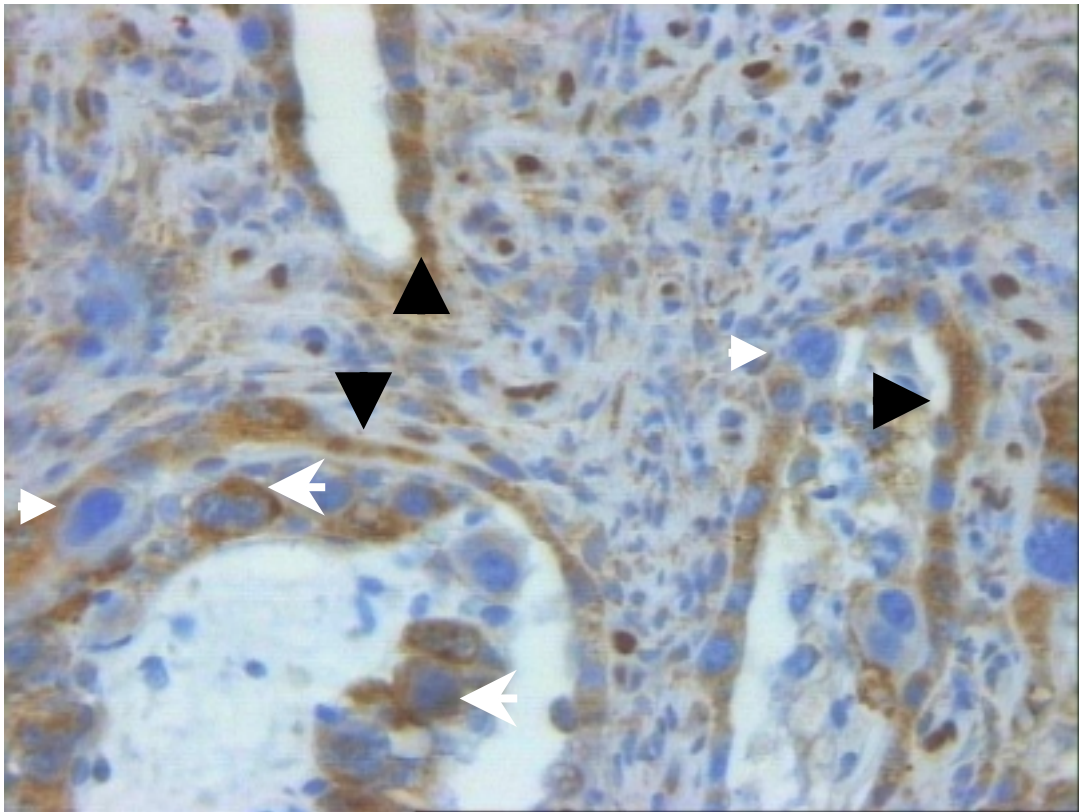


Abbildung 14: bFGF, mAK; Tag 240, Rd 16

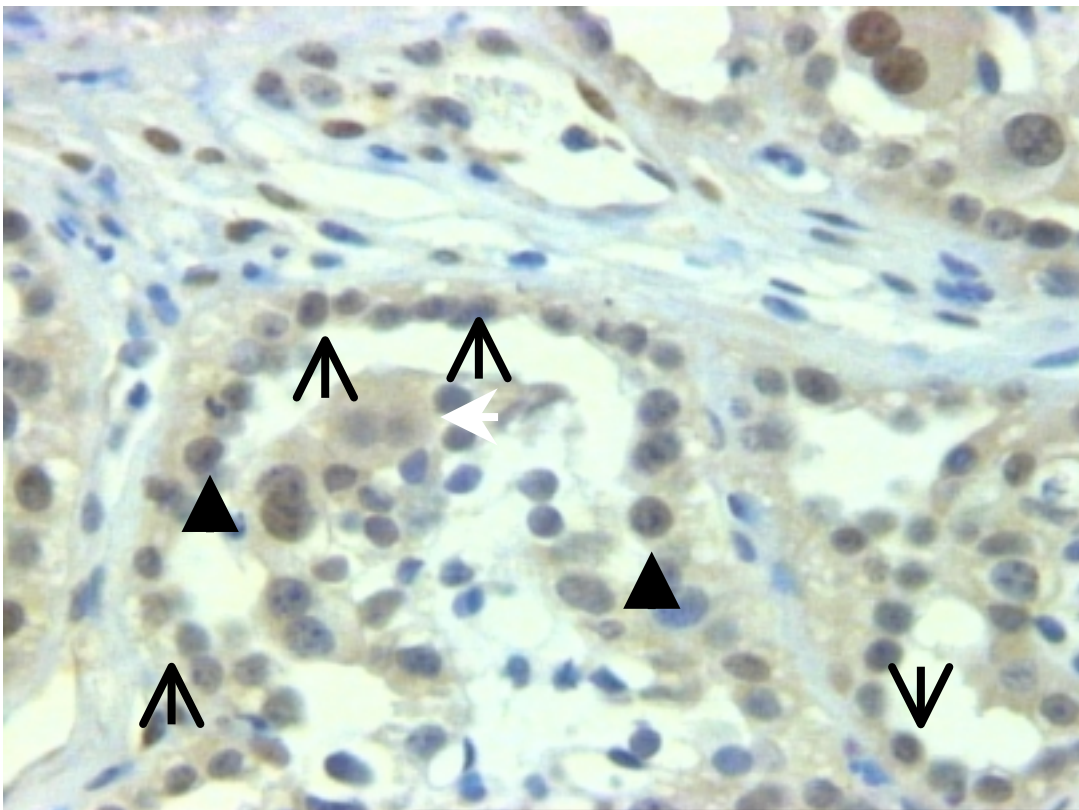


Abbildung 15: bFGF, pAK; Tag 240, Rd 20

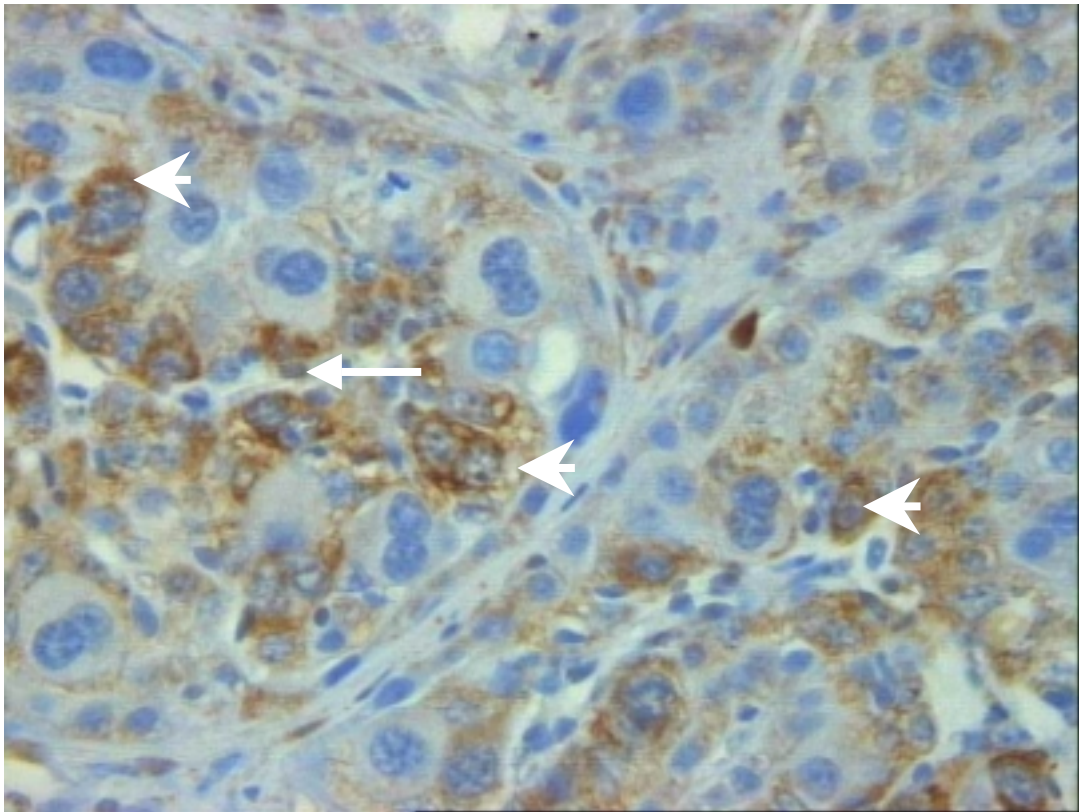


Abbildung 16: bFGF, mAK; Tag 270, Rd 24,6

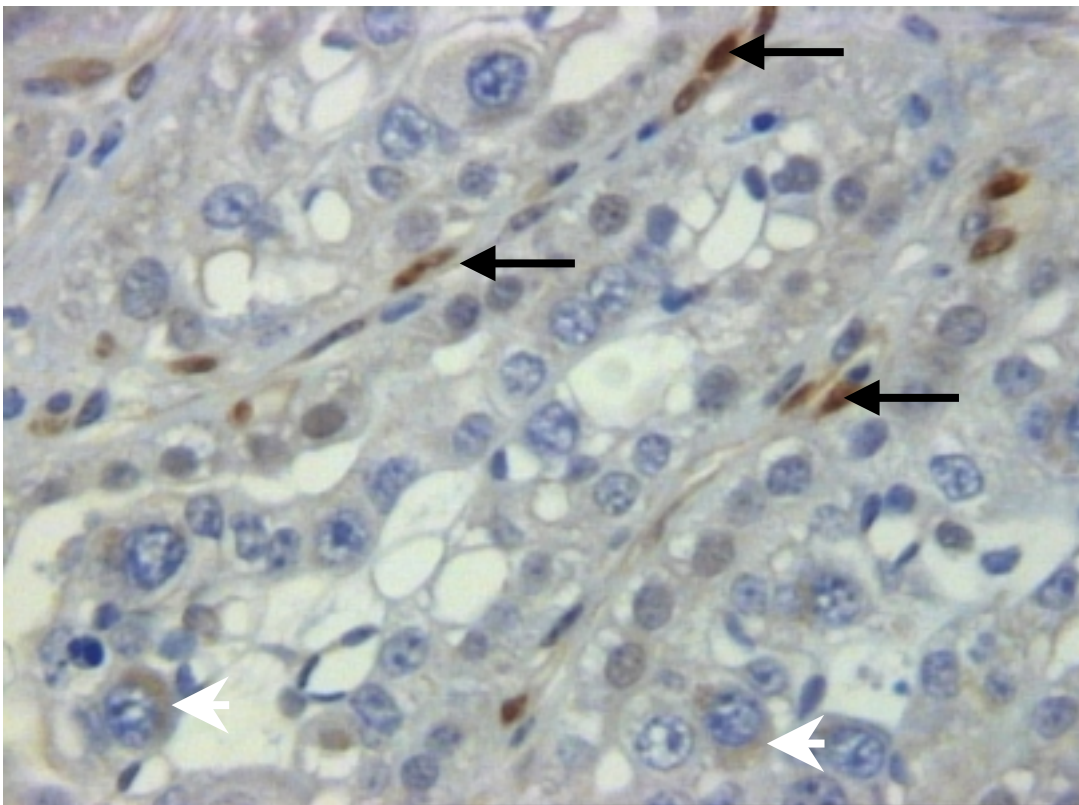


Abbildung 17: bFGF, pAK; Tag 270, Rd 18

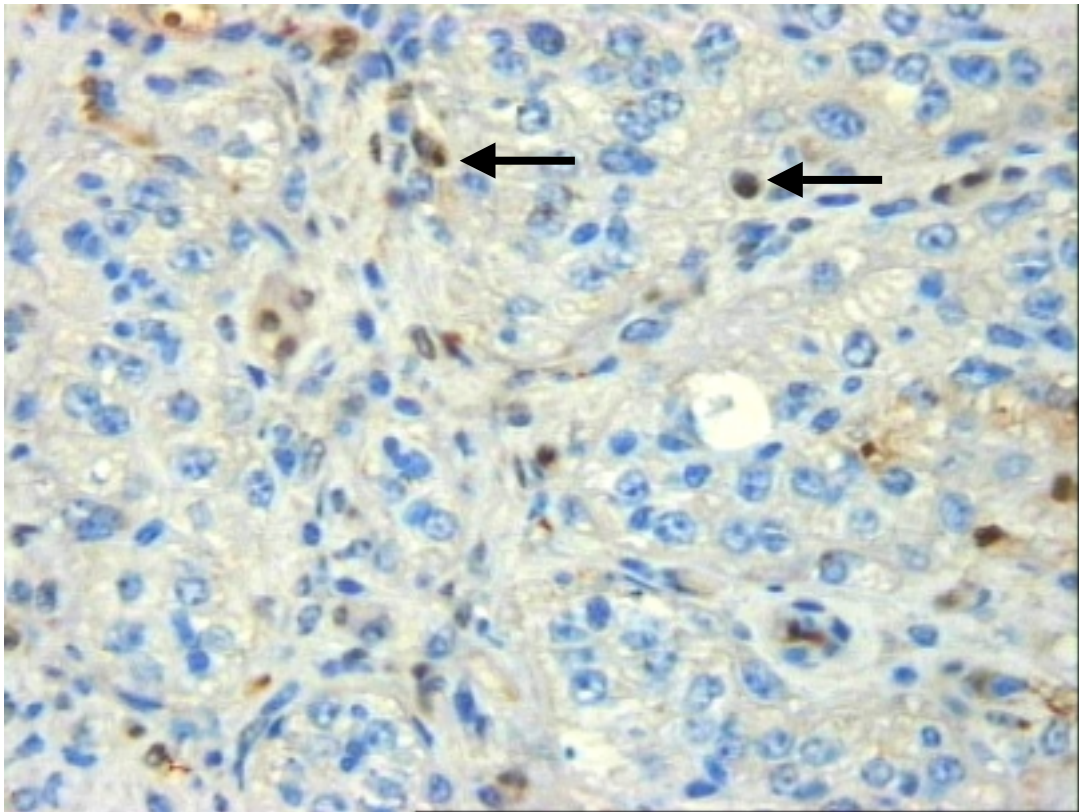


Abbildung 18: bFGF, mAK; Geburt, G 4

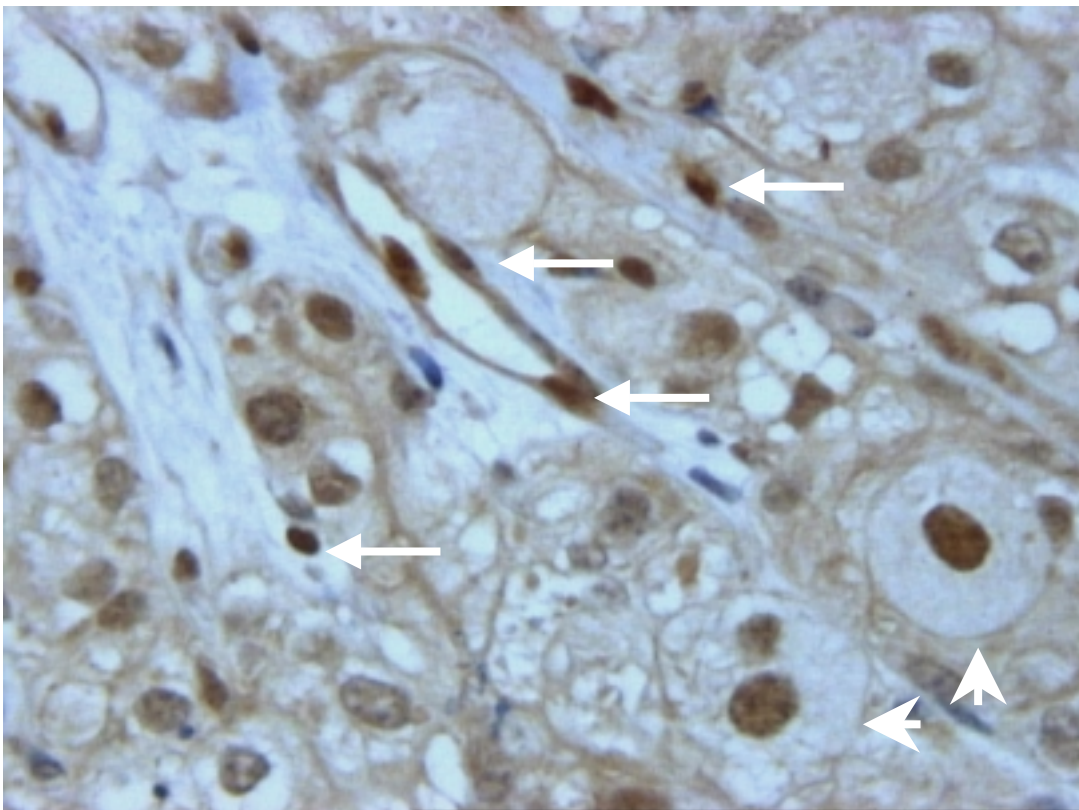


Abbildung 19: bFGF, pAK; Geburt, G4

4.1.2.3 Vergleich der Immunreaktionen beider gegen bFGF gerichteter Antikörper

Die Färbemuster der beiden eingesetzten Antikörper gegen bFGF unterscheiden sich hauptsächlich durch ihre Reaktionen in den epithelialen Anteilen der Plazenta, während die Reaktionen im maternalen und fetalen Stroma keine qualitativen Unterschiede aufweisen; beide Antikörper führen in allen untersuchten Stadien im maternalen und fetalen Stroma zu einem schwachen bis intensiven nukleären Signal, welches im fetalen Stroma, bezogen auf die Anzahl der positiv reagierenden Zellen, schwächer ist als im maternalen Stroma (siehe: Tabelle 12, Tabelle 13).

In den epithelialen Anteilen der Plazenta rief der monoklonale Antikörper mehr zytosolische, der polyklonale Antikörper mehr nukleäre Reaktionen hervor: Beim monoklonalen AK stand an den Tagen 150, 240 und 270 die schwache bis intensive zytosolische Reaktion vieler kleiner (unreifer) BNC und die etwas schwächere Reaktion der uninukleären Trophoblastzellen im Vordergrund. Die großen (reifen) BNC waren dagegen negativ. Das Karunkelepithel zeigte, außer am Tag 220, in vielen bis allen Zellen zytosolische Reaktionen (siehe: Tabelle 3, Tabelle 4). Beim polyklonalen Antikörper dominierten im Trophoblasten die schwachen bis intensiven nukleären Reaktionen einiger BNC das Färbemuster, während die zytosolische Reaktion des Trophoblasten deutlich schwächer als beim monoklonalen Antikörper war. Große (reife) und kleine (unreife) BNC reagierten beim polyklonalen Antikörper gleichartig (siehe: Tabelle 5, Tabelle 6).

Auffallend war, daß bei beiden Antikörpern am Tag 220 der Trächtigkeit bezüglich der Signalintensität und der Signalausbreitung der Tendenz nach eine Reduktion der Immunreaktion auftrat.

Unter der Geburt zeigten beide Antikörper für maternales Stroma, Karunkelepithel und fetales Stroma nicht nur die gleiche Färbereaktion, sondern auch die Zunahme der positiv reagierenden Zellen im maternalen Stroma. Beim Trophoblasten hingegen ergab sich bei Anwendung des monoklonalen Antikörpers ein negativer Befund, während der polyklonale Antikörper sowohl nukleäre als auch zytosolische Signale zeigte (siehe Tabelle 3 bis Tabelle 6).

4.1.3 Nachweis von TGF- α

Die Untersuchungen zum Nachweis von TGF- α müssen als nicht aussagefähig beurteilt werden, da die Negativkontrollen unter Verwendung des Non-Immunserums vom Schaf sowohl in den Versuchspräparaten als auch in den Kontrollgeweben (humanes Präputium, humaner Uterus) das gleiche Färbemuster ergaben wie bei Verwendung des Versuchsantikörpers (pAK Schaf anti human TGF- α). Die Negativkontrollen zur Überprüfung des sekundären Systems (Verwendung von PBS-Waschpuffer anstelle des AK I) zeigten dagegen keine Farbreaktion.

Unabhängig vom Trächtigkeitsstadium ergab sich in allen untersuchten Präparaten das gleiche Bild. Im fetalen und maternalen Stroma reagierten nahezu alle Stromazellkerne positiv, wobei die Endothelzellen rein nukleär reagierten, während die übrigen Zellen ein intensives nukleäres und deutliches perinukleäres Signal aufwiesen. In den epithelialen Anteilen der Plazentome (Karunkelepithel und Trophoblast) reagierten Zellkerne und Zytoplast aller Zellen einheitlich intensiv positiv.

4.2 *Immunhistologischer Nachweis der Wachstumsfaktor-Rezeptoren*

4.2.1 Nachweis des FGF-Rezeptors (FGF-R)

Das maternale Stroma zeigte an allen Trächtigkeitsstadien ein von schwach bis intensiv variierendes Signal der äußeren Zellmembran (perinukleäres Signal) bzw. des Zytoplasts der Stromazellen (siehe Abbildung 23: schwarze Pfeile). Dabei war die Anzahl der positiv reagierenden Zellen am Tag 150 gering, stieg an den Tagen 220 und 240 an und sank zum Tag 270 wieder ab. Unter der Geburt stieg die Anzahl der positiv reagierenden Zellen erneut an und das Gewebe reagierte wie an den Tagen 220 und 240. Das fetale Stroma reagierte zu allen untersuchten Stadien weitestgehend gleich und zeigte in einzelnen Zellen ein nukleäres und perinukleäres Signal (siehe Abbildung 21: weiße Pfeile), welches am Tag 150 sehr schwach bis schwach, an Tag 220 schwach bis intensiv und in allen anderen Stadien (Tag 240, 270, Geburt) schwach bis deutlich ausgeprägt war. Einzelne Präparate (siehe Tabelle 7, Tabelle 8 und Anhang: Tabelle 14: Rd 14, 15, 18) zeigten nur perinukleäre Reaktionen im fetalen Stroma (siehe Abbildung 20: weißer Pfeil). Da das Signal nicht gleichmäßig ausgebreitet war, fielen vollständig negative Regionen in den Präparaten auf (siehe: Tabelle 7, Tabelle 8); unter der Geburt waren die positiven

Reaktionen ausschließlich in den chorionnahen Plazentomabschnitten vorhanden. Das Karunkelepithel war an den Tagen 150 und Tag 220 negativ (siehe Abbildung 20: schwarze Pfeilspitzen), reagierte am Tag 240 in vielen Zellen schwach zytosolisch und überlappend schwach nukleär positiv (siehe Abbildung 22: schwarze Pfeilspitzen), wobei auch hier in den Präparaten vollständig negative Regionen auffielen. Am Tag 270 war das schwache Signal nur noch in einigen Zellen nachweisbar (siehe Abbildung 23: schwarze Pfeilspitze). Unter der Geburt war das Karunkelepithel nicht mehr eindeutig abgrenzbar. Im Trophoblasten reagierten beide Zelltypen (BNC und Uninukleäre) gleichartig und wiesen zu allen untersuchten Trächtigkeitsstadien und unter der Geburt ein parazelluläres, membranständiges bzw. zytosolisches Signal auf (siehe Abbildung 20 bis Abbildung 24: weiße Pfeilspitzen), welches an den Tagen 150, 220, 270 in vielen Zellen, am Tag 240 und unter der Geburt in nahezu allen Zellen auftrat. Am Tag 220 trat zusätzlich ein schwaches nukleäres Signal an einzelnen Zellen auf (in den Abbildungen nicht sichtbar), welches mit dem zytosolischen Signal überlappte; in diesem Stadium traten die Signale besonders in der Nähe großer Stromastraßen auf.

Abbildung 20 bis Abbildung 24

Nachweis von FGF-Rezeptor mit Hämatoxylin-Gegenfärbung (Vergrößerung 400x):
Fetale Gewebe werden mit weißen, maternale Gewebe mit schwarzen Symbolen gekennzeichnet, wobei Stromazellen mit Pfeilen und Epithelzellen mit Pfeilspitzen markiert werden:

- weiße Pfeile = fetale Stromazellen
- weiße Pfeilspitze = Trophoblastzellen
- schwarze Pfeile = maternale Stromazellen
- schwarze Pfeilspitze = Karunkelepithel

4.2.1.1 Darstellung der histologischen Präparate mit immunhistologischem Nachweis des FGF-Rezeptors

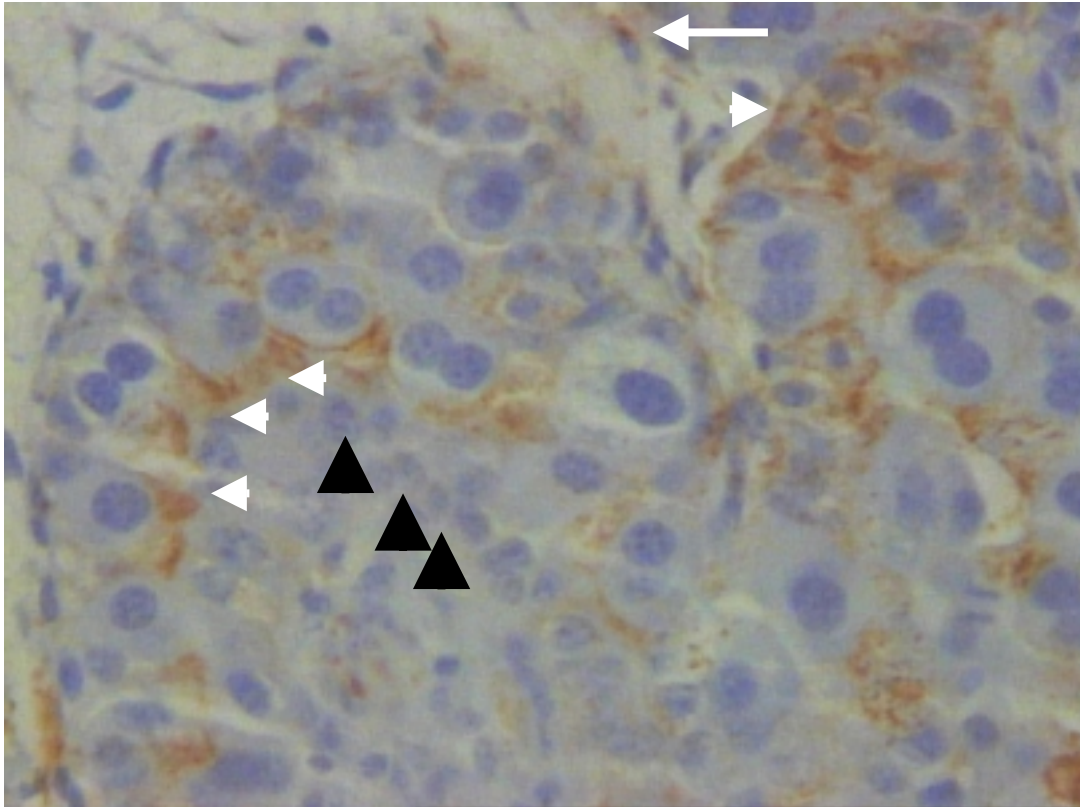


Abbildung 20: FGF-Rezeptor, Tag 150

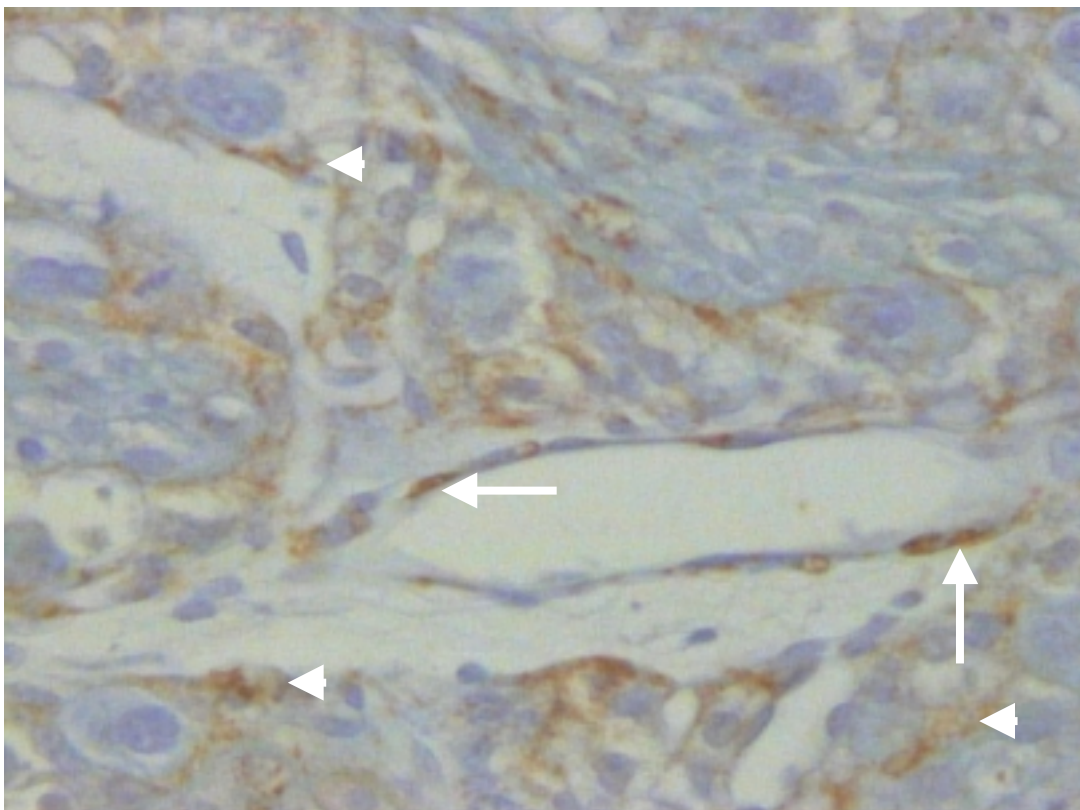


Abbildung 21: FGF-Rezeptor, Tag 220

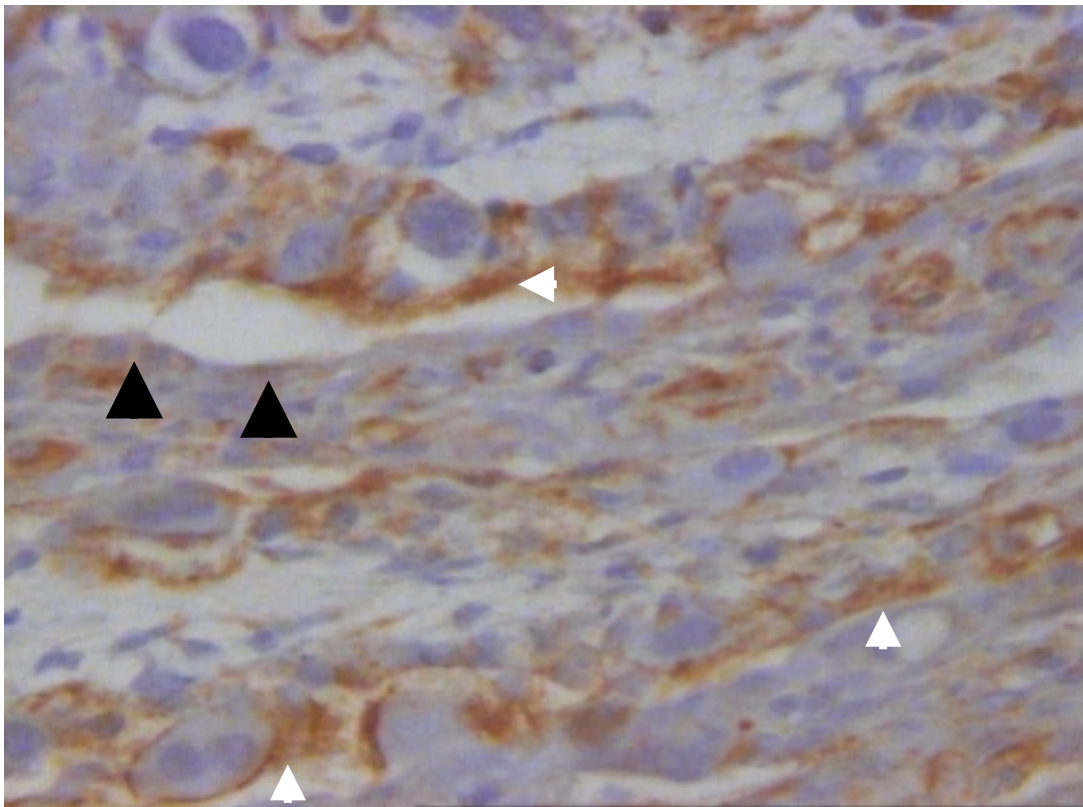


Abbildung 22: FGF-Rezeptor, Tag 240

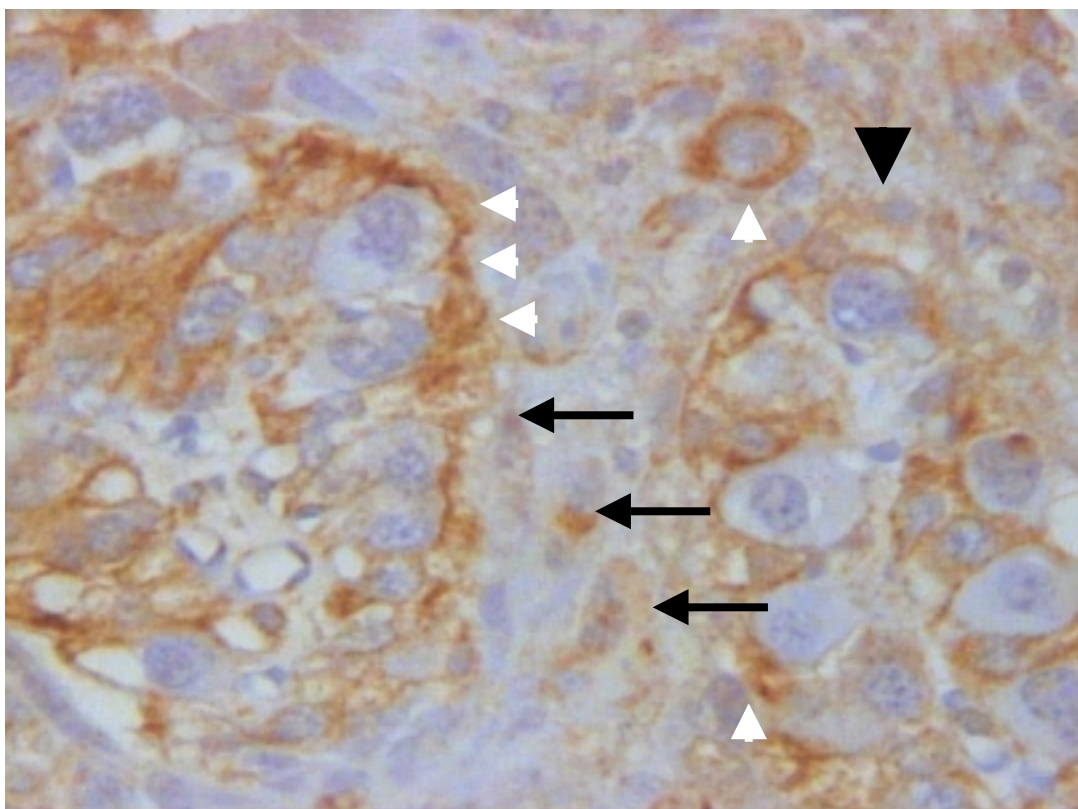


Abbildung 23: FGF-Rezeptor, Tag 270

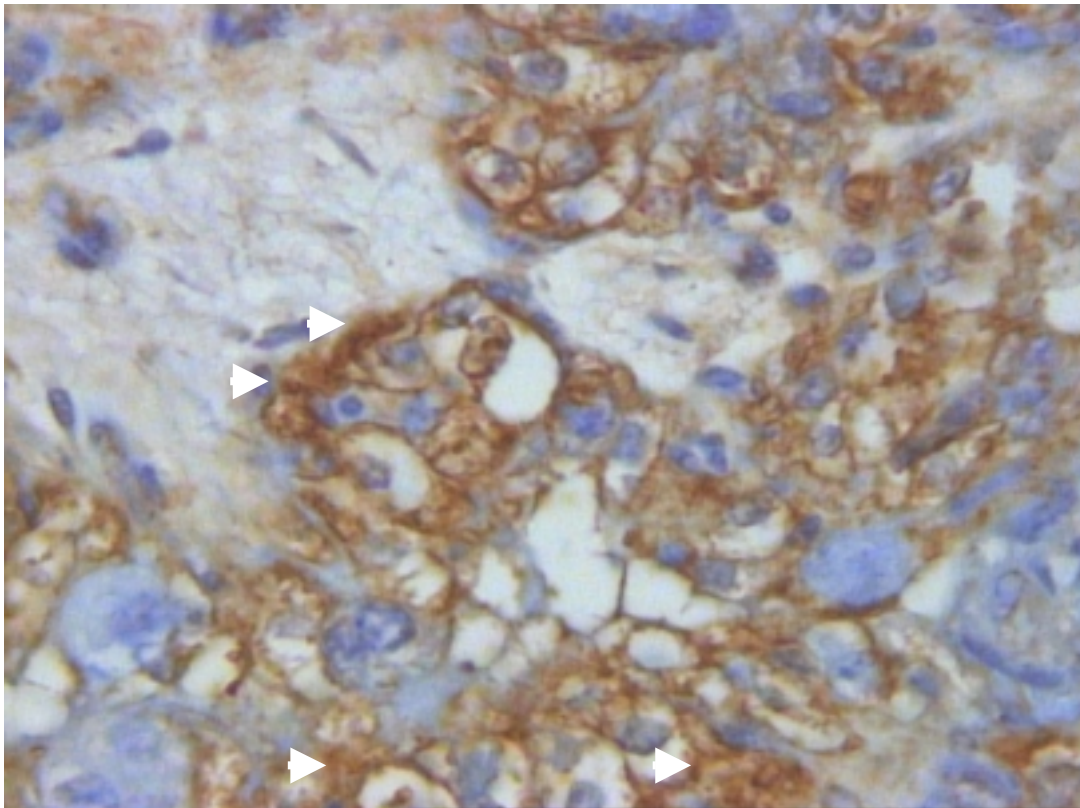


Abbildung 24: FGF-Rezeptor, Geburt

**Tabelle 7: Ergebnisse des immunhistologischen Nachweises des FGF-Rezeptors;
Zusammenfassung der Ergebnisse nach Trächtigkeitsstadien**

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel- epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 150	Rd 21 Rd 22 Rd 23	04-12 88-96 136-144	schwaches bis deutliches membranständiges/ zytosolisches Signal an einigen Stromazellen, überlappend schwaches nukleäres Signal in einigen Zellen es treten auch negative Regionen auf genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	negativ	sehr schwaches bis schwaches nukleäres und perinukleäres Signal in einzelnen Stromazellen es treten auch negative Regionen auf genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis deutliches parazelluläres, membran- ständiges/ zytosolisches Signal an vielen Zellen
Tag 220	Rd 14 Rd 15 Kuh 3	28-36 40-48 100-108	schwaches bis intensives membranständiges/ zytosolisches Signal an vielen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	negativ	schwaches bis intensives perinukleäres Signal in einzelnen Stromazellen es treten auch negative Regionen auf genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives parazelluläres, membran- ständiges/ zytosolisches Signal an vielen Zellen überlappend schwaches nukleäres Signal in einzelnen Zellen Signale treten besonders in der Nähe großer Stromastraßen auf
Tag 240	Rd 16 Rd 19 Rd 20	148-156 064-072 160-168	schwaches bis deutliches membranständiges/ zytosolisches Signal an vielen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches zytosolisches Signal in vielen Zellen überlappend schwaches nukleäres Signal in vielen Zellen es treten auch negative Regionen auf	schwaches bis deutliches nukleäres und perinukleäres Signal in einzelnen Stromazellen es treten auch negative Regionen auf genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	deutliches bis intensives parazelluläres, membran- ständiges/ zytosolisches Signal an nahezu allen Zellen

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel- epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 270	Rd 17 Rd 18 Rd 24	052-060 172-180 076-084	schwaches bis intensives membranständiges/ zytosolisches Signal an einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches zytosolisches Signal in einigen Zellen überlappend schwaches nukleäres Signal in einigen Zellen	schwaches bis deutliches nukleäres und perinukleäres Signal in einigen Stromazellen es treten auch negative Regionen auf genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives parazelluläres, membranständiges/ zytosolisches Signal an vielen Zellen
Geburt	G 2 G 4 G 5	016-024 124-132 112-120	schwaches bis deutliches membranständiges/ zytosolisches Signal an vielen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	nicht mehr eindeutig abgrenzbar	schwaches bis deutliches nukleäres und perinukleäres Signal in einzelnen Stromazellen (NUR IN CHORION-NÄHE!) genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives parazelluläres, membranständiges/ zytosolisches Signal an nahezu allen Zellen

Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse des immunhistologischen Nachweises des FGF-Rezeptors; Differenzierung nach Signalintensität (neg. = 0; schwach positiv = +; deutlich positiv = ++; intensiv positiv = +++) und Anzahl der betroffenen Zellen (keine = 0; einzelne Z. = +; einige Z. = ++; viele Z. = +++; nahezu alle Z. = ++++; alle Z. = +++++).
m. = membranständige Färbung, zyt. = zytosolische Färbung, nuk. = nukleäre Färbung, Uni = Uninukleäre, n. b. = nicht beurteilbar, SI = Signalintensität, ZA = Zellanzahl

Grav.- stadium und Tier	Auswertung								Mess- para- meter
	maternales Stroma		Karunkel- epithel		fetales Stroma		Trophoblast		
Tag 150	m.	+/++	m.	0	m.	0	m.	+/++	SI
		++		0		0		+++	ZA
Rd 21	zyt.	+/++	zyt.	0	zyt.	0	zyt.	+/++	SI
Rd 22		++		0		0		+++	ZA
Rd 23	nuk.	+	nuk.	0	nuk.	(+)/+	nuk.	0	SI
		++		0		+		0	ZA
		es treten auch negative Regionen auf Differenzierung des Zelltyps nicht möglich				Signale oft mit perinukleärer Beteiligung es treten auch negative Regionen auf Differenzierung des Zelltyps nicht möglich		membranständige Signale treten auch als parazelluläre Signale auf	
Tag 220	m.	+/+++	m.	0	m.	0	m.	+/+++	SI
		+++		0		0		+++	ZA
Rd 14	zyt.	+/+++	zyt.	0	zyt.	0	zyt.	+/+++	SI
Rd 15		+++		0		0		+++	ZA
Kuh 3	nuk.	0	nuk.	0	nuk.	+/+++	nuk.	+	SI
		0		0		+		+	ZA
		Differenzierung des Zelltyps nicht möglich				Signale sind nur perinukleär ausgeprägt		Signale überlappen treten bes. in der Nähe großer Stromastrassen auf membranständige Signale treten auch als parazelluläre Signale auf	

Grav.- stadium und Tier	Auswertung								Mess- para- meter
	maternales Stroma		Karunkel- epithel		fetales Stroma		Trophoblast		
Tag 240	m.	+/++	m.		m.		m.	++/+++	SI
		+++						++++	ZA
Rd 16 Rd 19 Rd 20	zyt.	+/++	zyt.	+	zyt.		zyt.	++/+++	SI
		+++		+++		++++		ZA	
	nuk.	0	nuk.	+	nuk.	+/++	nuk.	0	SI
0		+++		+		0		ZA	
	Differenzierung des Zelltyps nicht möglich		es treten auch negative Regionen auf		Signale oft mit perinukleärer Beteiligung es treten auch negative Regionen auf Differenzierung des Zelltyps nicht möglich		membranständi- ge Signale treten auch als parazelluläre Signale auf		
Tag 270	m.	+/+++	m.	0	m.	0	m.	+/+++	SI
		++		0		0		+++	ZA
Rd 17 Rd 18 Rd 24	zyt.	+/+++	zyt.	+	zyt.	0	zyt.	+/+++	SI
		++		+		0		+++	ZA
	nuk.	0	nuk.	+	nuk.	+/++	nuk.	0	SI
0		+		++		0		ZA	
	Differenzierung des Zelltyps nicht möglich				Signale oft mit perinukleärer Beteiligung es treten auch negative Regionen auf Differenzierung des Zelltyps nicht möglich		membranständi- ge Signale treten auch als parazelluläre Signale auf		
Geburt	m.	+/++	m.	n. b.	m.	0	m.	+/+++	SI
		+++		n. b.		0		++++	ZA
G 2 G 4 G 5	zyt.	+/++	zyt.	n. b.	zyt.	0	zyt.	+/+++	SI
		++++		n. b.		0		++++	ZA
	nuk.	0	nuk.	n. b.	nuk.	+/++	nuk.	0	SI
0		n. b.		+		0		ZA	
	Differenzierung des Zelltyps nicht möglich				Signale nur in Chorionnähe Differenzierung des Zelltyps nicht möglich		membranständi- ge Signale treten auch als parazelluläre Signale auf		

4.2.2 Nachweis des EGF-Rezeptors (EGF-R)

Wie aus den Tabelle 9 und Tabelle 10 (siehe auch Anhang: Tabelle 15) hervorgeht, waren maternales und fetales Stroma in allen Trächtigkeitsstadien und unter der Geburt überwiegend negativ. Nur einzelne Präparate (siehe Anhang: Tabelle 15, Rd 18, 19, 22, G 4) zeigten schwache bis deutliche (nur Rd 18) nukleäre oder zytosolische Reaktionen einzelner Endothel- bzw. Stromazellen (siehe Abbildung 31: schwarze Pfeile), wobei nur im fetalen Stroma die eindeutige Differenzierung von Endothelzellen möglich war (Letzteres ist in den Abbildungen nicht zu erkennen.). Das Karunkel epithel zeigte - außer am Tag 220 - in allen Trächtigkeitsstadien ein schwaches zytosolisches Signal nahezu aller (Tag 150) bzw. aller Epithelzellen (siehe Abbildung 26, Abbildung 30: offene schwarze Pfeilspitze). Zusätzlich trat in allen Trächtigkeitsstadien ein deutliches bis intensives parazelluläres bzw. membranständiges Signal auf, welches überwiegend an den dem Trophoblasten zugewandten Membranen des Epithels vorhanden war und die Form einer Mondsichel aufwies (siehe Abbildung 29); an den Tagen 220, 240 und 270 war das Signal teilweise auch als Ring um die Epithelzellen ausgeprägt (siehe Abbildung 28). Dieses Signal kann auf einzelne Zellen beschränkt sein (Tag 150, 220, 240) (siehe Abbildung 29), mehrere benachbarte Zellen (Tag 220, 270) gleichzeitig (siehe Abbildung 27) oder viele bis alle Zellen eines Zottenquerschnittes (Tag 270: „girlandenförmiges“ Signal [Abbildung 25 und Abbildung 30: geschlossene schwarze Pfeilspitzen]) betreffen. An den Tagen 220 und 240 war das Signal sporadisch im Schnitt verteilt und trat nur an einzelnen oder mehreren benachbarten Zellen auf (siehe Abbildung 27 bis Abbildung 29). Unter der Geburt waren vereinzelt intensive Signale im Bereich der fetomaternalen Kontaktzone erkennbar, die das Aussehen der membranständigen Signale der Trächtigkeitsstadien aufwiesen (siehe Abbildung 31).

Die Präparate von Tag 150 (siehe Abbildung 25 und Abbildung 26) und Tag 270 (siehe Abbildung 30) zeigten kein einheitliches Färbeverhalten: In diesen Trächtigkeitsstadien reagierte jeweils ein Präparat massiv positiv (Rd 21, Rd 17), während jeweils zwei Präparate dieser Stadien das membranständige Signal gar nicht aufwiesen, aber trotzdem zytosolisch positiv reagierten. Nur Rd 24 war in allen Zellpopulationen vollständig negativ (siehe Anhang: Tabelle 15).

Der Trophoblast reagierte an den Tagen 150, 240, 270 und unter der Geburt (siehe Abbildung 31) in nahezu allen Zellen schwach zyotosolisch (siehe Abbildung 25 und Abbildung 26: weiße Pfeilspitzen), am Tag 220 (siehe Abbildung 27 bis Abbildung 29) war er dagegen negativ.

Abbildung 25 bis Abbildung 31:

Nachweis des EGF-Rezeptors mit Hämatoxilin-Gegenfärbung (Vergrößerung: 400x):
Fetale Gewebe werden mit weißen, maternale Gewebe mit schwarzen Symbolen gekennzeichnet, wobei Stromazellen mit Pfeilen und Epithelzellen mit Pfeilspitzen markiert werden:

weiße Pfeilspitze = Trophoblastzellen

schwarze Pfeile = maternale Stromazellen

schwarze Pfeilspitze = Karunkel epithel:

offene Pfeilspitze \Rightarrow zyotosolische Reaktion

geschlossene Pfeilspitze \Rightarrow parazelluläre Reaktion

4.2.2.1 Darstellung der histologischen Präparate mit immunhistologischem Nachweis des EGF-Rezeptors

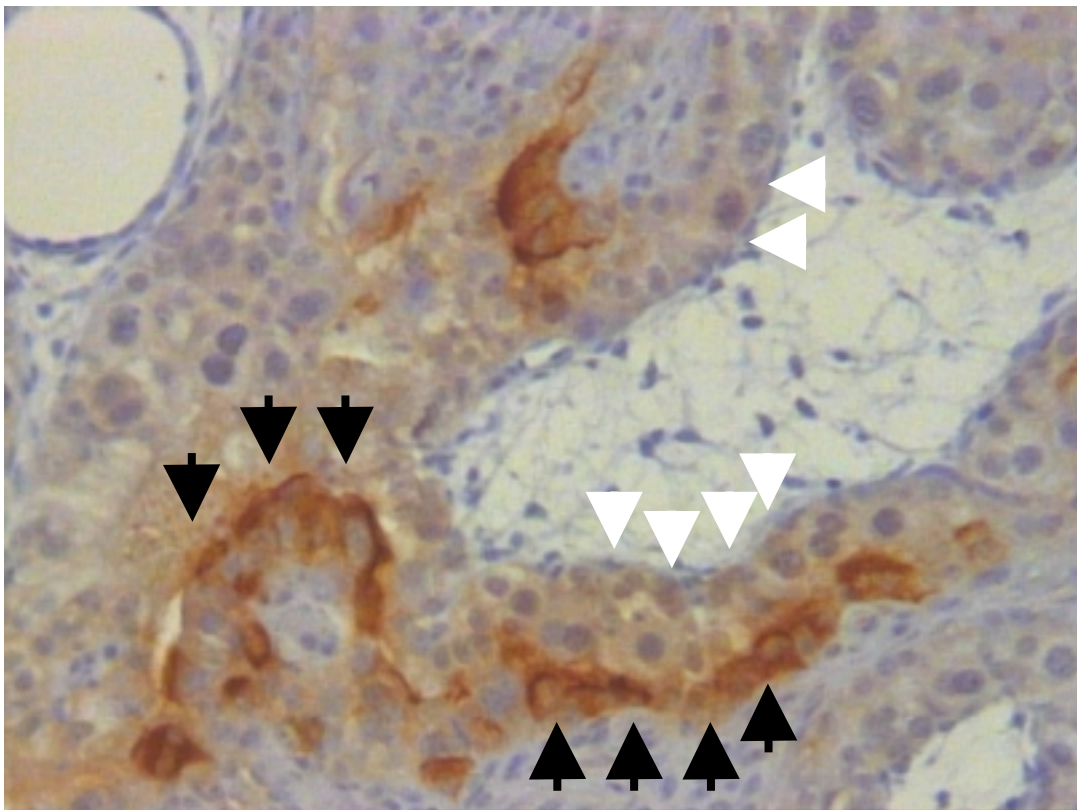


Abbildung 25: EGF-R, Tag 150, Rd 21

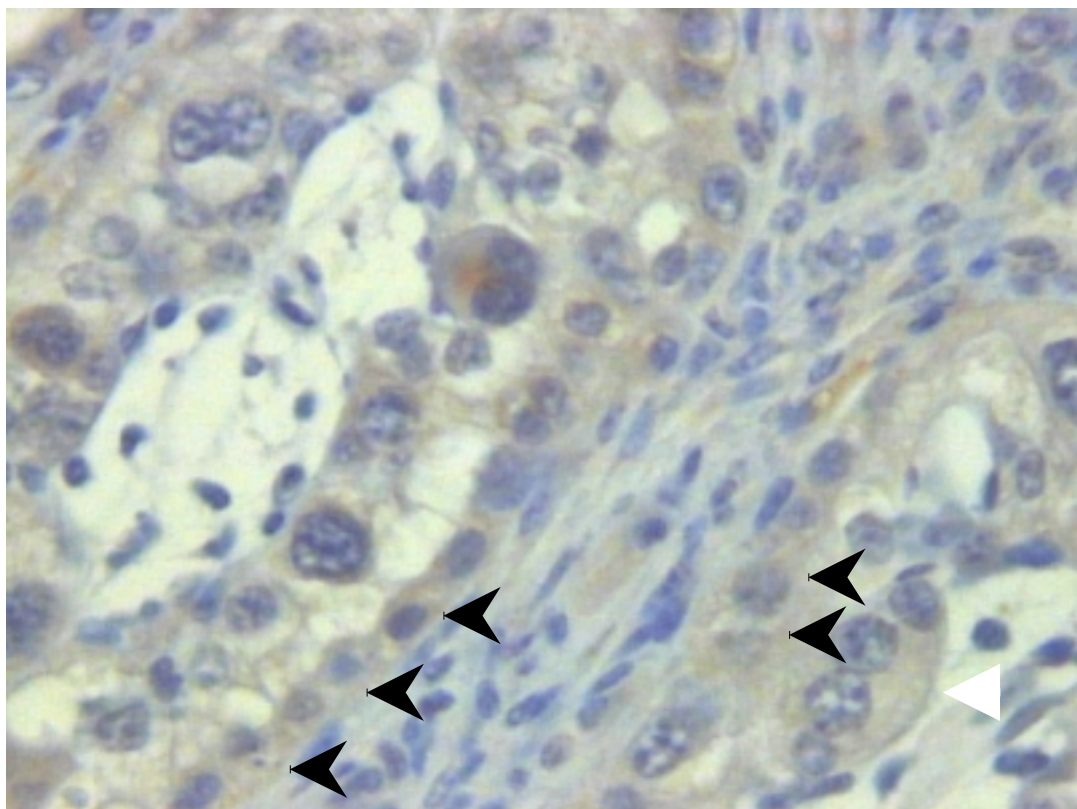


Abbildung 26: EGF-R, Tag 150, Rd 23

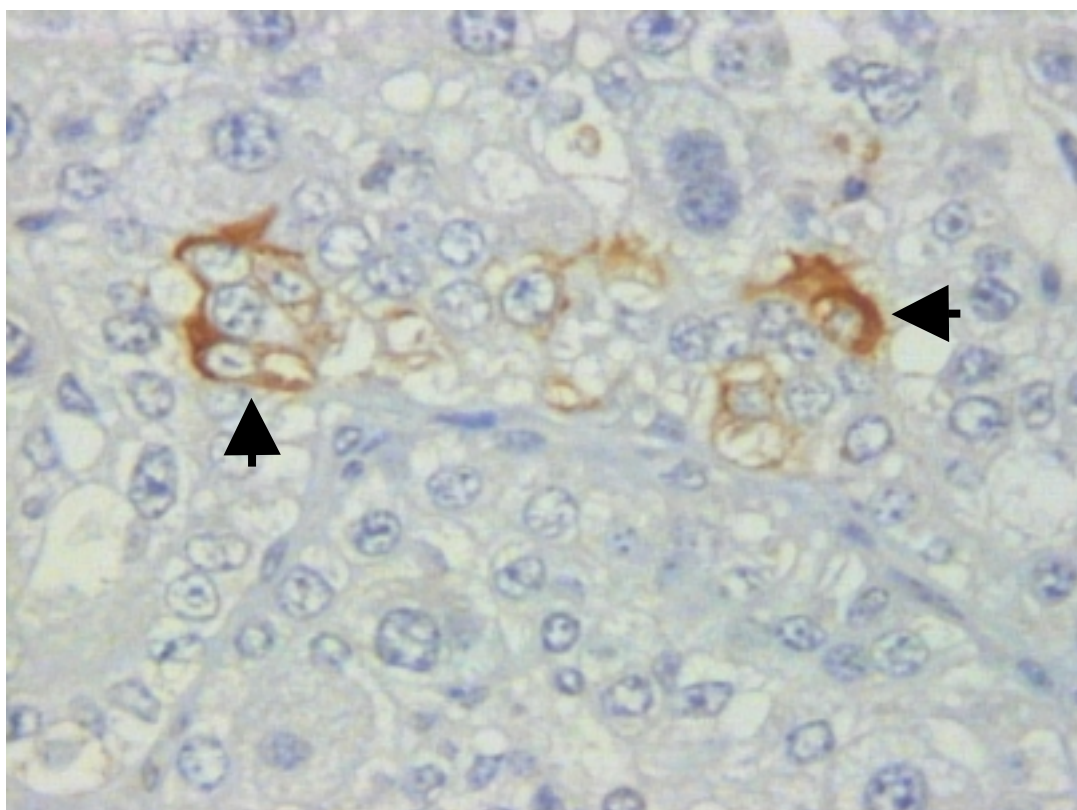


Abbildung 27: EGF-R, Tag 220, Kuh 3

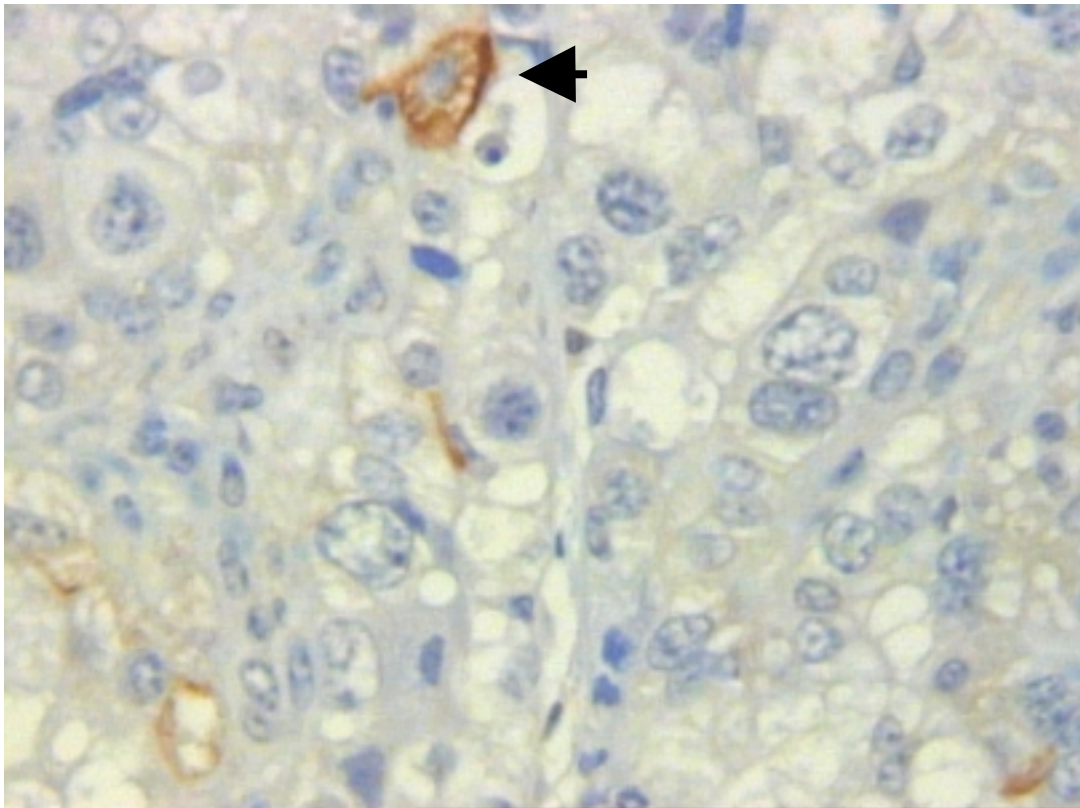


Abbildung 28: EGF-R, Tag 220, Kuh 3

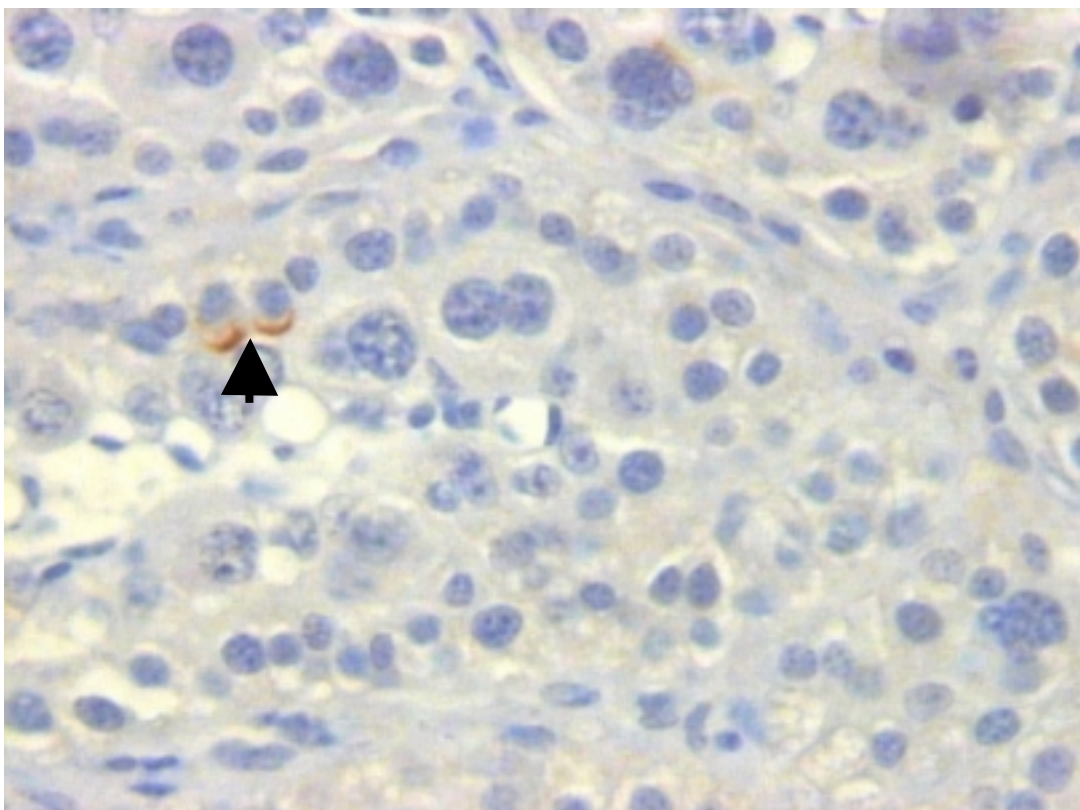


Abbildung 29: EGF-R, Tag 220, Rd 14

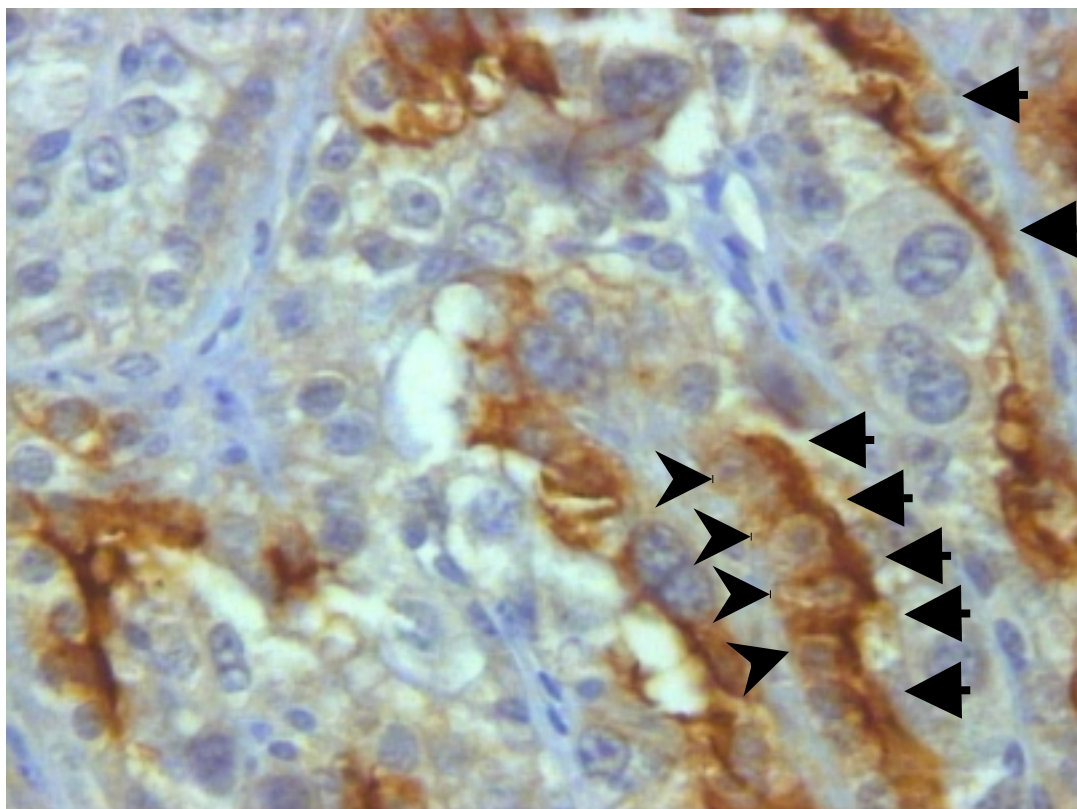


Abbildung 30: EGF-R, Tag 270, Rd 17

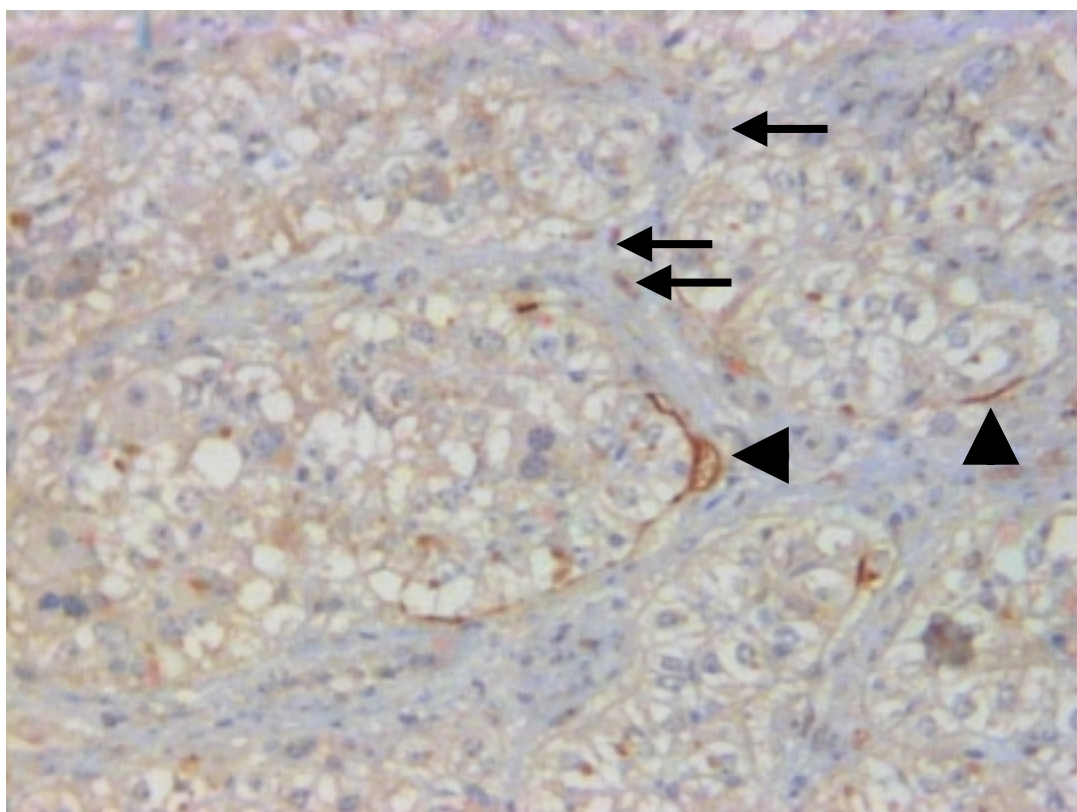


Abbildung 31: EGF-R, Geburt, G 4

**Tabelle 9: Ergebnisse des immunhistologischen Nachweises des EGF-R;
Zusammenfassung der Ergebnisse nach Trächtigkeitsstadien**

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkelepithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 150	Rd 21	04-12	schwaches	intensives	schwaches	intensives
	Rd 22	16-24	nukleäres	parazelluläres,	nukleäres	parazelluläres,
	Rd 23	28-36	Signal in einzelnen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	membranständiges, halbmondförmiges Signal an einigen einzelnen Zellen zum Trophoblasten hin zusätzlich intensives parazelluläres, membranständiges Signal an allen Zellen einzelner Zottenquerschnitte schwaches zytosolisches Signal in nahezu allen Zellen	Signal in einzelnen Endothel- zellen	membran- ständiges Signal an allen Zellen einzelner Zotten- querschnitte schwaches bis deutliches zytosolisches Signal an nahezu allen Zellen
Tag 220	Rd 14 Rd 15 Kuh 3	40-48 52-60 64-72	negativ	deutliches bis überwiegend intensives parazelluläres, membranständiges halbmond- bis ringförmiges Signal an einzelnen und auch an mehreren benachbarten Zellen einiger verschiedener Zottenquerschnitte zum Trophoblasten hin mit zytosolischer Beteiligung der betroffenen Zellen	negativ	negativ

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkelepithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 240	Rd 16 Rd 19 Rd 20	076-084 088-096 100-108	schwaches zytosolisches Signal in einzelnen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives parazelluläres, membranständiges halbmond- bis ringförmiges Signal an einzelnen Zellen verschiedener Zottenquerschnitte zum Trophoblasten hin schwaches zytosolisches Signal in allen anderen Zellen schwaches nukleäres Signal in einzelnen anderen Zellen	negativ	schwaches zytosolisches Signal in nahezu allen Zellen
Tag 270	Rd 17 Rd 18 Rd 24	112-120 124-132 136-144	schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in einzelnen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	intensives parazelluläres, membranständiges halbmond- bis ringförmiges Signal (bes. zum Trophoblasten hin!) an nahezu allen Zellen nahezu aller Zottenquerschnitte (girlandenartige Signale) schwaches zytosolisches Signal in allen anderen Zellen	negativ	schwaches zytosolisches Signal in nahezu allen Zellen schwaches nukleäres Signal in einzelnen BNC

Grav.-stadium	Tier	Bilder	Ausbildung			
			maternales Stroma	Karunkelepithel	fetales Stroma	Trophoblast
Geburt	G 3	148-156	schwaches	vereinzelt	schwaches	schwaches bis
	G 4	160-168	zytosolisches	deutliches	nukleäres	deutliches
	G 5	172-180	Signal in einigen Zellen, schwaches nukleäres Signal in einigen anderen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schnurartiges Signal im Bereich der fetomaternalen Kontaktzone Zellen selbst nicht mehr eindeutig abgrenzbar sieht wie Überreste einer girlandenförmigen Reaktion (z.B.: Rd 17) aus	Signal in einzelnen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	Signal an allen Zellen schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in allen Zellen schwaches nukleäres Signal in einigen Zellen

Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse des immunhistologischen Nachweises des EGF-Rezeptors, Differenzierung nach Signalintensität (neg. = 0; schwach positiv = +; deutlich positiv = ++; intensiv positiv = +++ und Anzahl der betroffenen Zellen (keine = 0; einzelne Z. = +; einige Z. = ++; viele Z. = +++; nahezu alle Z. = ++++; alle Z. = +++++)).
 nuk. = nukleäre Färbung, zyt. = zytosolische Färbung, par. = parazelluläre bzw. membranständige Färbung, Uni = Uninukleäre,
 n. b. = nicht beurteilbar, SI = Signalintensität, ZA = Zellanzahl, ZQA = Anzahl der Zottenquerschnitte, e Z = einzelne Zellen, ZQ = Zottenquerschnitte

Grav.- stadium und Tier	Auswertung									Mess- para- meter
	Mat. Stroma		Karunkelepithel			fetales Stroma		Trophoblast		
				e Z	ZQ					
Tag 150	nuk.	+	nuk.	0	0	nuk.	+	nuk.	0	SI
		+		0	0		+		0	ZA
Rd 21	zyt.	0	zyt.	0	0	zyt.	0	zyt.	0	SI
Rd 22		0		0	0		0		0	ZA
Rd 23			par.		+			par.	+	ZQA
				+++	+++				+++	SI
				++	+++++				+++++	ZA
		Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich			betroffene Zellen sind Endothelzellen					

Grav.- stadium und Tier	Auswertung									Mess- para- meter
	mat. Stroma		Karunkel epithel			fetales Stroma		Trophoblast		
				e Z	ZQ					
Tag 220	nuk.	0	nuk.	0	0	nuk.	0	nuk.	0	SI
		0		0	0		0		0	ZA
Rd 14 Rd 15 Kuh 3	zyt.	0	zyt.	+/+++	+/+++	zyt.	0	zyt.	0	SI
		0		+	++/ +++		0		0	ZA
			par.		++			par.	0	ZQA
				++/ +++	++/ +++				0	SI
+				++/ +++	0				ZA	
		betroffene Zellen auch zyt. positiv								
Tag 240	nuk.	0	nuk.	+		nuk.	0	nuk.	0	SI
		0		+			0		0	ZA
Rd 16 Rd 19 Rd 20	zyt.	+	zyt.	+		zyt.	0	zyt.	+	SI
		+		++++			0		++++	ZA
			par.		+			par.	0	ZQA
				+/	+/				0	SI
				+++	+++				0	ZA
			+							
Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich		zytosolische Signale treten nur in Zellen ohne nuk./par. Signale auf								
Tag 270	nuk.	0	nuk.	0	0	nuk.	0	nuk.	0	SI
		0		0	0		0		0	ZA
Rd 17 Rd 18 Rd 24	zyt.	+/+++	zyt.	+	0	zyt.	0	zyt.	+	SI
		+		+	0		0		++++	ZA
			par.		++++			par.	0	ZQA
					+++				0	SI
				++++	0				ZA	
Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich		Signale sind girlandenförmig								

Grav.- stadium und Tier	Auswertung									Mess- para- meter
	mat. Stroma		Karunkelepithel			fetales Stroma		Trophoblast		
				e Z	ZQ					
Geburt	nuk.	+	nuk.	n. b.	n. b.	nuk.	+	nuk.	+	SI
		++		n. b.	n. b.		+		++	ZA
G 3 G 4 G 5	Zyt.	+	zyt.	n. b.	n. b.	zyt.	0	zyt.	+ / ++	SI
		++		n. b.	n. b.		0		+++++	ZA
			par.	n. b.	n. b.			par.	+++++	ZQA
				n. b.	n. b.				+ / ++	SI
				n. b.	n. b.				+++++	ZA
Differenzie- rung des Zelltyps nicht möglich keine Signalüber- lappung in den Zellen		Vereinzelt deutliches schnurartiges Signal in Bereich der fetomaternalen Kontaktzone, Zellen selbst nicht mehr abgrenzbar sieht wie Überreste der girlandenförmigen Reaktion aus			Differenzierung des Zelltyps nicht möglich					

5 Diskussion

Ziel vorliegender Untersuchung war es, weitere Informationen über den Zeitpunkt und die Lokalisation der Expression von Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren in den Plazentomen von Rindern, sowie über die Veränderungen der Verteilungsmuster der einzelnen Wachstumsfaktoren/-rezeptoren im Verlauf der Trächtigkeit und unter der Geburt zu bekommen.

5.1 *Diskussion der Methodik*

5.1.1 Allgemeine Aspekte

Immunhistochemische Verfahren werden seit 1940 angewendet (BEESLEY, 1995) und sind heute weit verbreitete, etablierte, spezielle Techniken, die verwendet werden, um das Vorkommen und/oder die Lokalisation von Ag in Geweben oder Zellen darzustellen (BOENISCH, 1989; BEESLEY, 1995). Die in der vorliegenden Studie angewandte ABC-Komplex-Methode zeichnet sich – im Vergleich mit anderen immunenzymatischen Verfahren - durch eine hohe Sensitivität aus, die auch den Nachweis geringer Ag-Mengen ermöglicht (BOENISCH, 1989) (siehe Kapitel: 3.1.2.2.1, Seite 45).

Aus der breiten Palette kommerziell erhältlicher biotinylierter AK zum Nachweis von Wachstumsfaktoren/-rezeptoren standen nur für aFGF, bFGF und den FGF-R spezifische, gegen das Rind gerichtete Antikörper zur Verfügung; für den Nachweis von TGF- α und EGF-R wurde auf gegen den Menschen gerichtet Antikörper zurückgegriffen. Da sowohl TGF- α als auch EGF-R in der Evolution hochkonservierte Proteine darstellen, sind hohe Homologien zwischen den humanen und bovinen Wachstumsfaktoren/-rezeptoren zu erwarten (siehe Kapitel: 2.2.2, Seite 25 für TGF- α und Kapitel: 2.3.2, Seite 36 für EGF-R), die ein Benutzen der „speziesfremden“ Antikörper erlauben sollten. Ebenso weisen die Angaben in den Datenblättern der Vertreiber dieser Antikörper deren Eignung zum Nachweis der bovinen Wachstumsfaktoren bzw. –rezeptoren aus. Die Spezifität der AK wurde von den Herstellern der Antikörper und teilweise zusätzlich in den eigenen Untersuchungen durch den Einsatz von Positivgeweben (Corpus luteum für bFGF, Koronarvene für FGF-R, Mammatumor für EGF-R) geprüft. Außerdem wurde mit Hilfe verschiedener Negativkontrollen (Einsatz von Substitutions-AK und PBS-Waschpuffer anstelle des

AK I) sowohl die Reaktion des AK I, als auch die des Sekundärsystems auf ihre Spezifität in jedem Versuch neu überprüft (siehe Kapitel 3.2.6, Seite 56). Mit Hilfe der Vorversuche wurden für die jeweiligen AK geeignete Versuchsprotokolle erarbeitet und anschließend die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse überprüft. Alle durchgeführten Vor- und Hauptversuche wurden ausschließlich von einer Person und unter gleichbleibenden Bedingungen durchgeführt. Um an sehr warmen Tagen die Einflüsse der Außentemperatur möglichst gering zu halten, wurden während der Sommermonate die Versuche in den kühlen Morgenstunden durchgeführt, so daß auch alle „bei Raumtemperatur“ durchgeführten Inkubationen (siehe Kapitel: 3.2.7, Seite 59) bei annähernd gleichen Außentemperaturen stattfanden. Die Zuverlässigkeit der Untersuchungsmethode und die Sicherheit der erzielten Ergebnisse kann aufgrund dieser Maßnahmen als sehr hoch eingestuft werden.

Das in der vorliegenden Studie angewandte immunenzymatische Verfahren ist ein semiquantitatives Verfahren, das nur das Vorhandensein bzw. Fehlen der gesuchten Substanzen anzeigen kann. Ein bewertender Vergleich der Intensität der Immunreaktion (stärkere Immunreaktion = mehr Ag vorhanden) zwischen verschiedenen Präparaten ist nur dann sinnvoll, wenn es sich dabei um das gleiche Gewebe handelt und alle Präparate von der Gewebeentnahme bis zum Versuchsabschluß grundsätzlich absolut gleich behandelt wurden. In den vorliegenden Untersuchungen ist daher ein Vergleich der Färbeintensitäten zwischen den Präparaten der Trächtigkeit und den unter der Geburt entnommenen Plazentomen nur bedingt möglich, da letztere nur immersionsfixiert wurden, während die anderen Plazentome zunächst perfundiert und danach erst immersionsfixiert wurden. Auch der Vergleich der Reaktionsintensität der verschiedenen Trächtigkeitsstadien untereinander ist problematisch, da es im Laufe der Trächtigkeit zur Abflachung des Karunkel epithels und zur Verbreiterung der Bindegewebssepten kommt (WOICKE et al., 1986), wodurch sich die optische Dichte der histologischen Schnitte verändert. Bei gleicher Mikroskopeinstellung erscheinen die histologischen Schnitte mit hohen Stromaanteilen wesentlich heller als die Schnitte mit hohen Epithelanteilen, wodurch eine objektive Beurteilung der Reaktionsintensität beeinflusst werden kann. Bei den Schnitten mit hohen epithelialen Anteilen wird tendenziell die Immunreaktion intensiver erscheinen als in Schnitten mit hohen Stromaanteilen.

Dagegen läßt sich das Verteilungsmuster (Ausbreitung des Signals über den gesamten histologischen Schnitt, Beteiligung der einzelnen Zellpopulationen) des DAB-Signals sehr gut vergleichen.

Aussagen über die Menge (quantitative Erfassung) und den Ursprung (maternal/fetal, Zelltyp) der gefundenen Ag können mit der vorliegenden Studie nicht getroffen werden. Zur Klärung letzterer Fragen wäre eine Folgestudie, die sich mit der biochemischen bzw weiteren molekularbiologischen Untersuchung der Plazentome befaßt, wünschenswert.

5.1.2 Spezielle Aspekte zum immunhistologischen Nachweis von aFGF

In der vorliegenden Studie konnte das Vorkommen des Wachstumsfaktors aFGF in der Rinderplazenta von Tag 150 bis 270 der Trächtigkeit und unter der Geburt nachgewiesen werden. Die vom Hersteller im Datenblatt angegebenen Eigenschaften des gegen bovines aFGF gerichteten Antikörpers und die Ergebnisse der Negativkontrollen zur Überprüfung des primären und des sekundären Systems sprechen für die Richtigkeit der erhaltenen Ergebnisse.

Im Allgemeinen wird ein einheitliches, wenig differenziertes oder diffuses immunhistochemisches Signal als unspezifisch beurteilt, da nicht zu unterstellen ist, daß alle Zellen einer Population die gleiche Antigenmenge enthalten (BOURNE, 1989). Obwohl in den eigenen Untersuchungen die Rinderplazentome für aFGF – bezogen auf die untersuchten Stadien - ein nur wenig differenziertes, gleichbleibendes Reaktionsmuster zeigten, spiegeln die variablen Reaktionsintensitäten (schwaches bis intensives nukleäres bzw. zytosolisches Signal) der einzelnen Zellen einer Zellpopulation innerhalb eines Präparates den unterschiedlichen Antigengehalt dieser Zellen wider (siehe Kapitel: 4.1.1, Seite 71). Diese Beobachtung läßt darauf schließen, daß die immunhistologische Färbereaktion von aFGF sich zwar wenig differenziert darstellt, aber trotzdem als spezifisch angesehen werden kann.

5.1.3 Spezielle Aspekte zum immunhistologischen Nachweis von bFGF

Der Nachweis von bFGF in der Plazenta des Rindes erfolgte mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Antikörpern, die ähnliche, aber nicht identische, Reaktionsmuster aufwiesen. Bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers fielen die überwiegend zytosolischen Reaktionen der epithelialen Plazentomanteile auf, während der polyklonale Antikörper durch seine schwachen bis intensiven nukleären Reaktionen auffiel. Für bFGF gilt, daß die niedermolekulare Form hauptsächlich im Zytosol gelagert bzw. exportiert und auf der Zelloberfläche gelagert wird, während die größeren bFGF-Isoformen nukleär nachweisbar sind (BUGLER et al., 1991; FLORKIEWICZ et al., 1991). Demnach kann angenommen werden, daß der kommerziell erworbene monoklonale Antikörper, der laut Herstellerangaben ausschließlich die 16 bis 18 kDa großen Isoformen erkennt, die Verteilung des sogenannten niedermolekularen bFGF anzeigt, während die Ergebnisse nach Anwendung des polyklonalen Antikörpers die Vermutung nahelegen, daß letzterer Antikörper die höhermolekularen Isoformen von bFGF erkennt.

Unbeschadet der Plausibilität der erhaltenen Ergebnisse kamen bei beiden AK verschiedene Negativkontrollen zur Anwendung. So wurde, trotz der vom Hersteller im Westernblot nachgewiesenen Spezifität des monoklonalen Antikörpers, dieser zusätzlich durch den Einsatz eines Isotypen-Kontrollantikörpers (siehe Kapitel: 3, Seite 43) überprüft. Auch wurde das sekundäre System (AK II und ABC-Komplex) durch die Verwendung von PBS-Waschpuffer anstelle des Primärantikörpers überprüft. Es ergaben sich keine Hinweise auf unspezifische Reaktionen. Auch beim polyklonalen Antikörper wurde das sekundäre System durch eine PBS-Waschpuffer-Negativkontrolle getestet. Das primäre System (AK I) wurde hier durch den Einsatz eines Non-Immunserums (siehe Kapitel: 3.2.8.2, Seite 63) und durch den Einsatz eines Positivgewebes (C.I. des Rindes) überprüft; Hinweise auf unspezifische Reaktionen ergaben sich nicht. Somit kann davon ausgegangen werden, daß die immunhistologischen Färbereaktionen der beiden gegen bFGF eingesetzten Antikörper in der vorliegenden Studie spezifische Reaktionen zwischen Primärantikörper und gesuchtem Antigen darstellen.

5.1.4 Spezielle Aspekte zum immunhistologischen Nachweis von TGF- α

In vorliegender Arbeit gelang es nicht, den Wachstumsfaktor TGF- α in der Plazenta des Rindes spezifisch nachzuweisen. Zwar war die in den Versuchen aufgetretene Farbreaktion eindeutig auf das Binden des verwendeten AK I zurückzuführen, da die PBS-Negativkontrolle (Substitution des AK I durch PBS-Waschpuffer) in allen Schnitten als negativ beurteilt und die unspezifischen Reaktionen des AK II durch den Einsatz eines unkonjugierten AK gleicher Klasse blockiert wurden; allerdings führte die Substitution des polyklonalen AK I aus dem Schaf durch ein Non-Immunserum aus dem Schaf zu exakt dem gleichen Färbemuster wie der AK I. Die beobachtete Farbreaktion muß auf eine Reaktion der Schaf-Immunglobuline mit dem Rindergewebe zurückgeführt werden, die nicht das Resultat der gewünschten Ag-AK-Bindung sein kann.

Als Ursache dafür können elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Gewebe- und Reagenzproteinen sowie endogene Enzymaktivitäten auf Grund der durchgeführten Behandlungen der Präparate (siehe Kapitel: 3.2.8.3, Seite 64) weitestgehend ausgeschlossen werden. Auch das Vorliegen von natürlichen und kontaminierenden AK kann ausgeschlossen werden, da die verwendeten Antiseren (AK I und inaktiviertes Schafserum) aus unterschiedlichen Individuen stammen. Daß in beiden Tieren die gleichen natürlichen bzw. kontaminierenden AK vorliegen sollen, erscheint unwahrscheinlich, da der AK I aus den USA stammte, während das Schafserum von einem institutseigenem Schaf gewonnen wurde. Auch treten natürliche und kontaminierende AK nur in geringen Konzentrationen auf, so daß sich deren Reaktivität durch ausreichend hohe Verdünnung der im Versuch eingesetzten Antiseren (1:2000) hätte ausschalten lassen müssen (BOENISCH, 1989). Auch eine Kreuzreaktivität der in beiden Antiseren auftretenden AK mit dem Plazentomgewebe erscheint eher unwahrscheinlich, da das inaktivierte Schafserum der Negativkontrolle einen Pool aus vielen unterschiedlichen AK verschiedener Ig-Klassen darstellt, die gegen ein breites Spektrum von Epitopen gerichtet sind, nicht aber gegen humanes TGF- α . Das spezifische Erkennen eines ähnlichen Epitopes im Sinne einer spezifischen Kreuzreaktion (siehe Kapitel: 3.1.5.2.3, Seite 50) dürfte bei den sehr unterschiedlichen Antiseren nicht zu den exakt gleichen Färbereaktionen führen.

Möglicherweise beruht das beobachtete Phänomen auf einer Bindung der Schafantikörper an sogenannte Fc-Rezeptoren. Fc-Rezeptoren sind Membranglykoproteine, welche die Fc-Fragmente von AK binden können. Sie haben ein Molekulargewicht von ca. 50 – 70 kD, machen weniger als 1% der Membranglykoproteine aus und weisen eine starke Klassen-/Subklassen- und Speziesspezifität auf (BOENISCH, 1989). Die Speziesspezifität würde erklären, warum das beschriebene Phänomen in der vorliegenden Studie nur bei der Verwendung von Schafantikörpern auftrat. In der Literatur wurden allerdings keine Hinweise auf das Vorhandensein von Fc-Rezeptoren in der Rinderplazenta gefunden; in der humanen Plazenta wurden dagegen drei unterschiedliche Fc-Rezeptoren für IgG gefunden (BRIGHT et al., 1994). Dennoch muß darauf hingewiesen werden, daß laut BOENISCH (1989) Fc-Rezeptoren instabil und detergenzienlöslich sind. Es bleibt fraglich, ob die Fixierung der Plazentome mit 4% phosphatgepuffertem Formalin und die Behandlung der histologischen Präparate mit Tween 20® nicht zur Zerstörung eventuell vorhandener Fc-Rezeptoren geführt hätte.

An diesem Beispiel wird verdeutlicht, wie wichtig zur Sicherung der Ergebnisse das Durchführen verschiedener Negativkontrollen, insbesondere der isotypischen Kontrolle, ist. Ein immunhistologischer Nachweis einer Substanz kann nur dann als richtig und sicher angesehen werden, wenn sowohl primäres als auch sekundäres Nachweissystem hinreichend ausgetestet wurden.

5.1.5 Spezielle Aspekte zum immunhistologischen Nachweis des FGF-Rezeptors (FGF-R)

Mit Hilfe der in vorliegender Arbeit verwendeten immunhistochemischen Methode konnte ein plausibles Färbemuster für den Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 von FGF (FGF-R 1, auch als flg bezeichnet) erzeugt werden. Dennoch sind die Ergebnisse nur unter Vorbehalt als sicher einzustufen. Als Primärantikörper wurde ein kommerziell vertriebener und aus der Maus stammender, monoklonaler, gegen den Rinder FGF-R gerichteter Antikörper des Typs IgM eingesetzt. Laut Angaben im Datenblatt war der Antikörper gegen ein Proteinepitop des FGF-R 1 gerichtet, zeigte aber im geringeren Grad auch eine Kreuzreaktivität mit FGF-R 2. Durch eine Reihe von Vorversuchen konnte zunächst ohne Probleme ein geeignetes Versuchsprotokoll erarbeitet werden. Die dabei durchgeführten PBS-Negativkontrollen (Substitution des AK I durch PBS-Waschpuffer) verliefen bis auf leichte Hintergrundreaktionen

weitestgehend negativ. Die Durchführung der Isotypenkontrolle des Primärantikörpers stellte sich als ausgesprochen schwierig dar, da nur wenige Laboratorien Kontrollantikörper für die Immunglobulinklasse IgM verwenden. Die in Katalogen kommerziell angebotenen Antikörper sind zwar als Isotypenkontrollen produziert worden, wurden aber im Hinblick auf ihre Funktion nicht eingehend getestet. Insgesamt fünf verschiedene Kontrollantikörper wurden ausgetestet, wobei vier dieser Antikörper nicht funktionierten. Diese vier Antikörper erzeugten - bezogen auf die Signalintensität und die Signalausbreitung im Gewebe - in den Negativkontrollen wesentlich stärkere Reaktionen als der Primärantikörper in den Positivschnitten. Auffallend war, daß alle Kontrollantikörper jede Gewebestruktur in den histologischen Schnitten (Plazentome und Kontrollgewebe!) völlig undifferenziert und einheitlich intensiv braun färbten. Damit wurde deutlich, daß die Kontrollantikörper bestimmte Strukturen in den Schnitten erkannten, die häufiger in den Schnitten auftraten als der an den Primärantikörper bindende FGF-R. Auf gezieltes Anfragen bei den Herstellern stellte sich heraus, das die isotypischen Kontrollen in aller Regel gegen sogenannte „nicht biologische Haptene“ gerichtet sind. Bei der Produktion der Antikörper werden diese Haptene an Trägermoleküle gekoppelt. Bei zwei der vier eingesetzten Antikörper wurden die Haptene an BSA (Bovines Serumalbumin) gekoppelt; ein dritter Kontrollantikörper war gegen eine „clonotypische Stelle des T-Zellrezeptors“ gerichtet, wobei dieses biologische Hapten ebenfalls an BSA gekoppelt wurde. Da keiner der Kontrollantikörper durch die Hersteller getestet wurde, ist nicht mit Sicherheit zu sagen, ob die Kontrollantikörper gegen das Trägermolekül BSA oder gegen das „nicht biologische Hapten“ gerichtet waren. Die Färbereaktionen in dieser Studie lassen vermuten, daß die eingesetzten Kontrollantikörper gegen das Trägermolekül gerichtet waren, da in den Plazentomen und im Kontrollgewebe (bovine Koronarvene) BSA regulär auftreten kann. Der vierte dieser Kontrollantikörper war laut Aussagen der Hersteller gegen einen nicht weiter definierbaren „aromatischen Kohlenwasserstoff“ gerichtet. Da auch dieser Antikörper nicht auf seine Spezifität geprüft wurde, ist nicht mit Sicherheit zu sagen, welche Strukturen er erkennt. Allerdings kann davon ausgegangen werden, daß in den eingesetzten histologischen Präparaten sowohl Kohlenwasserstoffe als auch aromatische Kohlenwasserstoffen auftreten. Der fünfte und offensichtlich funktionierende Kontrollantikörper war ein monoklonaler Maus IgM κ , der gegen Trinitrophenol-KLH (keyhole limpet hemocyanin) gerichtet war und von den

Herstellern (Pharmingen International) auch auf seine Spezifität getestet wurde. Allerdings ergaben sich auch bei dieser isotypischen Negativkontrolle in nahezu allen Präparaten leichte diffuse Braunschleier.

5.1.6 Spezielle Aspekte zum immunhistologischen Nachweis des EGF-Rezeptors (EGF-R)

Der in dieser Studie verwendete Antikörper zur Detektion des EGF-R war ein in der Maus produzierter monoklonaler und gegen ein Kohlenhydrat-Epitop der extrazellulären Domäne des humanen EGF-R gerichteter Antikörper der Klasse IgG 1 κ , der auch den EGF-R der Maus erkennt, die Bindung von EGF an den Rezeptor aber nicht beeinflusst. Obwohl beim Hersteller des Antikörpers keine Informationen darüber zu erhalten waren, ob der benutzte Antikörper tatsächlich in der Lage ist, den bovinen EGF-R zu erkennen, besteht nach Durchführung der immunhistologischen Färbung kein Zweifel an der Spezifität dieser Reaktion. Das in dieser Studie dargestellte Reaktionsmuster in den Plazentomen von Rindern entspricht den vom Hersteller dokumentierten Färbebildern humaner Karzinomzellen. Auch die Ergebnisse der durchgeführten Negativkontrollen (Nonsens-Antikörper, PBS-Negativkontrolle, siehe Anhang: Tabelle 15) und die Färbung des Positivgewebes (humaner Mammatumors) sprechen für die Richtigkeit der Ergebnisse. Zusätzlich ist der EGF-R - ähnlich wie der FGF-Rezeptor - ein in der Evolution hoch konserviertes Protein, so daß auch zwischen dem bovinen und humanem EGF-R hohe Homologien zu erwarten sind (CARPENTER und WAHL, 1990).

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Immunhistologischer Nachweis von aFGF

Unabhängig vom Trächtigkeitsstadium tritt aFGF in der zweiten Hälfte der Gravidität sowohl in den Stromaanteilen der Plazentome als auch in den epithelialen Anteilen auf. Unter der Geburt ist die Expression von aFGF kaum verändert (siehe Kapitel: 4, Tabelle 1, Tabelle 2 und Anhang: Tabelle 11). Die Bedeutung von aFGF für die Angiogenese und die mitogene Wirkung auf mesenchymale und neuroektodermale Zellen – insbesondere auf Fibroblasten - ist seit langem bekannt (GOSPODAROWICZ et al., 1980) und läßt das Auftreten von aFGF in der Plazenta plausibel erscheinen. Auch die beobachtete nukleäre Reaktion der Zellen aller

Zellpopulationen ist ein Indiz für die biologische Aktivität des Faktors, da nur von Zellen exogen aufgenommenes aFGF in den Kern transportiert wird, während endogen gebildetes aFGF nicht in den Zellkern transportiert wird (ZHAN et al., 1992). Daraus folgt, daß in den Zellen mit nukleärer Reaktion eine aktive Aufnahme des Wachstumsfaktors stattgefunden hat. Damit ist ohne Zweifel die Bedeutung von aFGF für die Wachstums- und Differenzierungsprozesse in den untersuchten Stadien der Rinderplazenta erkennbar.

Untersuchungen von LEISER et al. (1997 b) haben gezeigt, daß auch noch nach Tag 170 der Trächtigkeit Wachstums- und Umbauprozesse in der Rinderplazenta stattfinden, die nicht nur auf das Stroma und die Angiogenese beschränkt sind, sondern auch die epithelialen Gewebeanteile einschließen. Auch parallel durchgeführte Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zur Proliferation der Zellen zeigten, daß in den untersuchten Trächtigkeitsstadien in allen Zellpopulationen der Rinderplazenta Proliferation auftritt (SCHULER et al., 2000). Somit ist die positive Reaktion aller Zellpopulationen auf die Färbung von aFGF in den untersuchten Plazentomen verständlich und könnte im Zusammenhang mit den proliferativen Prozessen gesehen werden.

Würde sich die Funktion von aFGF in der Rinderplazenta allerdings ausschließlich auf proliferative Prozesse beschränken, wäre in den einzelnen Trächtigkeitsstadien und unter der Geburt ein differenzierteres Reaktionsmuster zu erwarten; so zeigten die Untersuchungen von SCHULER et al. (2000), daß die Proliferationsraten in Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstadium schwanken, wobei jede Zellpopulation zu einem anderen Trächtigkeitsstadium ein Proliferationsmaximum aufwies: Das maternale Stroma zeigt unter der Geburt die höchste Proliferation, das Karunkel epithel am Tag 270, das fetale Stroma am Tag 150 und der Trophoblast am Tag 220. Tendenziell ist die Proliferation am Tag 220 am niedrigsten; unter der Geburt ist nur noch im maternalen Stroma Proliferation vorhanden. Die höchsten Proliferationsraten treten im Karunkel epithel, die niedrigsten im fetalen Stroma auf. Da aFGF in den vorliegenden Untersuchungen in allen untersuchten Stadien – von einer leichten Depression am Tag 220 abgesehen – mit weitgehend gleichbleibenden Reaktionsmuster auftritt, ist daher möglicherweise davon auszugehen, daß aFGF in den Plazentomen neben einer mitogenen auch eine nicht-mitogene Wirkung aufweist.

Eine solche nicht-mitogene Wirkung von aFGF wird in der Modulation der zellulären Differenzierung und der Zellmigration gesehen (BAIRD und BÖHLEN, 1990), auch eine Beeinflussung der BNC durch aFGF ist möglich und erscheint plausibel. Die unreifen und jungen BNC sind kleine, zytoplasmaarme Zellen, die in der Tiefe des Trophoblasten liegen. Während ihrer Entwicklung und Differenzierung zu großen, zytoplasmareichen, mehrkernigen Zellen wandern die BNC aus der Tiefe des Trophoblasten an die Oberfläche und dringen in das maternale Uterusepithel ein, wo sie schließlich degenerieren (WIMSATT, 1951). Die Differenzierung der BNC und die Wanderung in das Karunkel­epithel könnten möglicherweise durch die nicht-mitogenen Wirkungen von aFGF beeinflusst werden. Da der Anteil der BNC an der Gesamtzahl der Trophoblastzellen ca. 15 – 20% beträgt und sich über die Dauer der Gravidität kaum verändert (WOODING und FLINT, 1984), kann eine kontinuierliche Neubildung vorausgesetzt werden, welche die ständige Anwesenheit von aFGF erklären kann.

Tendenziell scheint die nukleäre Reaktion in den reifen (großen) BNC stärker als in den kleinen BNC ausgeprägt zu sein. Im Zellkern kann aFGF nur während der G1-Phase des Zellzyklus – also zum Zeitpunkt der RNA-Synthese, der Bildung zytoplasmatischer Proteine und des Wachstums – nachgewiesen werden, während die zytosolische Lokalisation in allen Phasen des Zellzyklus möglich ist (IMAMURA et al., 1994). Das deutet darauf hin, daß sich die reifen BNC überwiegend in der G1-Phase (= Gap 1-Phase) des Zellzyklus befinden, welche auch als Ruhephase der Zellen bezeichnet wird.

Möglicherweise spielt aFGF auch bei der Ablösung der Plazenta eine Rolle. Bis heute ist der genaue Mechanismus der Plazenta-Ablösung nicht bekannt. Möglicherweise spielt der unter der Geburt zu beobachtende Vitalitätsverlust und das Absterben von BNC eine Rolle (WILLIAMS et al., 1987; GROSS et al., 1991). Wie und warum es zum Vitalitätsverlust bzw. Absterben der BNC kommt ist nicht geklärt; diskutiert werden die Zerstörung der BNC im fetalen Gewebe und/oder die Migration in das Karunkel­epithel mit anschließender Degeneration sowie der Wegfall des Stimulus, welcher die Neubildung der BNC anregt. GROSS et al. (1991) vermuten, daß das Verschwinden der BNC zum Verlust von Faktoren (Glykoproteine, Kollagene, Struktur und Erhaltung der Synzytien) führt, welche für die Haftung der Plazenta notwendig sind bzw. durch die Freisetzung hydrolytischer Enzyme zur

Zerstörung der Faktoren führt, welche die plazentare Haftung ermöglichen. Da aFGF die Proteinbiosynthese und nachfolgend die zelluläre Proteinsekretion modulieren kann (BAIRD und BÖHLEN, 1990), ist ein Einfluß des Faktors auf die Ablösung der Plazenta denkbar und kann die Expression des Wachstumsfaktors in den Plazentomen unter der Geburt erklären.

Das Auftreten von aFGF im maternalen Stroma unter der Geburt erscheint auf den ersten Blick zunächst wenig sinnvoll, da die Plazenta mit Beginn der Geburt ihre Aufgabe erfüllt hat. Mit dem Abgang der Nachgeburt ist definitionsgemäß die Geburt – und damit auch die Trächtigkeit - beendet, allerdings muß nun der gesamte weibliche Genitaltrakt wieder involvieren. Die im Uterus verbliebenen maternalen Plazentaanteile müssen resorbiert und der Uterus, in Vorbereitung auf den nächsten Zyklus, vollständig auf die prägravide Größe rückgebildet werden. Für diesen Vorgang ist die Ausprägung eines potenten Kapillarbettes notwendig. Das unter der Geburt im maternalen Stroma vorhandene aFGF könnte hier nicht nur die Angiogenese fördern und so die Grundlage für die resorptiven Vorgänge im Genitaltrakt bilden sondern nach Ablösung der Plazenta auch zur Reepithelisierung der Karunkelanlagen dienen. Im adulten Organismus kann aFGF an Wunden die Angiogenese und die Bildung von Granulationsgewebe und das Wachstum von Epithel induzieren (MELLIN et al., 1992). Schon 1990 beschrieben BAIRD und BÖHLEN die durch aFGF induzierte Einsprossung von Kapillaren in geschädigtes Gewebe.

Ungeklärt bleibt, von welchen Zellen und in welchem Zeitraum der Faktor gebildet wird. Da aFGF eine hohe Affinität zu Heparin und ähnlichen hochsulfatierten Glykosaminoglykanen hat (GOSPODAROWICZ und CHENG, 1986), ist es möglich, daß in früheren Trächtigkeitsstadien gebildetes aFGF in hohen Mengen an Zelloberflächen und in der ECM gebunden wurde und dort in einer biologisch inerten Form in direkter Nachbarschaft zu seinen Zielzellen gelagert und nach Bedarf aus der Heparinbindung freigesetzt wird (LOGAN und HILL, 1992). Mit der vorliegenden Untersuchung ist es nicht möglich, zwischen neu exprimiertem und gelagertem/inertem aFGF zu unterscheiden. Eine Untersuchung der Plazentome mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung könnte klären, wann und in welchen Zellen aFGF gebildet wird.

5.2.2 Immunhistologischer Nachweis von bFGF

Der Nachweis von bFGF in der Plazenta des Rindes mit Hilfe zweier unterschiedlicher Antikörper ergab ähnliche - aber nicht identische – Reaktionsmuster, wobei auf die Wahrscheinlichkeit, daß durch die beiden AK unterschiedliche Isoformen des bFGF erkannt wurden, bereits im Kapitel: 5.1.3 auf Seite 117 verwiesen wurde.

Der monoklonale Antikörper, welcher ausschließlich die niedermolekularen Isoformen (16 bis 18 kDa) erkennt, reagierte in den epithelialen Anteilen der Plazentome praktisch nur zytosolisch, während der polyklonale Antikörper, der die höhermolekularen Isoformen erkennt, neben schwächeren zytosolischen Reaktionen auch schwache bis intensive nukleäre Signale aufwies. Die unterschiedlichen Entwicklungs- bzw. Reifestadien der BNC reagierten beim polyklonalen Antikörper gleichartig, während der monoklonale Antikörper nur in den kleinen, unreifen BNC zytosolische Signale hervorrief und in den großen, reifen BNC negativ blieb. Maternales und fetales Stroma reagierten mit beiden Antikörpern gleich und wiesen ein schwaches bis intensives nukleäres Signal auf, welches - bezogen auf die Anzahl der positiv reagierenden Zellen – im fetalen Anteil etwas schwächer war als im maternalen Stroma. Auffallend waren die bei beiden Antikörpern auftretende Reduktion des immunhistologischen Signals am Tag 220 und die Zunahme der positiv reagierenden Zellen im maternalen Stroma unter der Geburt.

Auch bFGF entfaltet, ähnlich wie aFGF, sowohl mitogene als auch nicht-mitogene Wirkungen. Die nicht-mitogenen Wirkungen entsprechen denen von aFGF und beinhalten die Modulation der zellspezifischen Proteinbiosynthese, der zellulären Proteinsekretion, der Lebensdauer kultivierter Zellen, der zellulären Differenzierung, der Chemotaxis und Zellmigration (BAIRD und BÖHLEN, 1990). Die starke mitogene Wirkung von bFGF auf Zellen mesodermalen Ursprungs wurde insbesondere an Gefäßendothelien und Gefäßmuskelzellen, aber auch an Myoblasten, Nebennierenrindenzellen und Granulosazellen des Rindes beobachtet und beruht auch hier auf der Verkürzung der G1-Phase des Zellzyklus (GOSPODAROWICZ et al., 1980; BAIRD und BÖHLEN, 1990).

Da bFGF ein sehr wichtiger und potenter Angiogenesefaktor ist (GOSPODAROWICZ et al., 1986 a/b; BAIRD und BÖHLEN, 1990), kann sein Auftreten in der Plazenta –

insbesondere in den Stromaanteilen der Plazentome – in direktem Zusammenhang mit dem Wachstum von Blutgefäßen betrachtet werden. Mit fortschreitender Trächtigkeit wurde eine deutliche Verbreiterung der maternalen Stromasträßen beobachtet, während sich die fetalen Stromasträßen nur mäßig verbreiterten; diese Beobachtungen decken sich – bezogen auf die Gesamtzahl der positiv reagierenden Zellen - mit dem im Vergleich zum maternalen Stroma insgesamt schwächer ausgeprägten Signalen des fetalen Stromas (siehe Kapitel 4.1.2, Tabelle 3 bis Tabelle 6 und Anhang: Tabelle 12, Tabelle 13). Untersuchungen von LEISER et al. (1997 a/b) zeigten, daß in der zweiten Hälfte der Trächtigkeit in Rinderplazentomen nicht nur eine Neubildung von fetalen Zotten, sondern auch ausgeprägte Umbauprozesse auftreten, welche die Architektur des fetalen Gewebes incl. seines Blutgefäßsystems verändern. So kommt es nicht nur zu einem Zuwachs an fetalen Gefäßen (durch Neubildung fetaler Zotten), sondern durch eine verstärkte Aufknäulung von Kapillaren und die steigende Anzahl von Anastomosen auch zur Veränderung der Architektur des Kapillarbettes in den fetalen Zotten. Diese Umbauprozesse dienen der Verbesserung des transplazentaren Stoffaustausches, um mit fortschreitender Trächtigkeit eine ausreichende Versorgung des wachsenden Fetus zu sichern. Die Anastomosierung der Kapillarknäule und die Vergrößerung des Kapillarbettes können als Reaktion auf den sinkenden Sauerstoffgehalt in der Plazenta interpretiert werden. Unter Einfluß von bFGF wird in ischämischen Geweben die Ausbildung von Kollateralgefäßen und die Neovaskularisation beschleunigt (BAFFOUR et al., 1992). Der positive immunhistologische Nachweis von bFGF in den Rinderplazentomen kann daher als ein Hinweis auf die Beeinflussung dieser Wachstums- und Umbauprozesse durch bFGF in den Plazentomen von Rindern gewertet werden. Das Vorkommen von bFGF in den Stromaanteilen der Plazentome unter Geburt steht vermutlich – ähnlich wie bei aFGF - mit den zu erwartenden umfassenden Involutionen am weiblichen Genitaltrakt im Zusammenhang.

Die Reaktionen in den epithelialen Gewebeanteilen sind wahrscheinlich weniger mit proliferativen Vorgängen als mit Differenzierungsprozessen und der Beeinflussung der Proteinsynthese in Verbindung zu bringen. Die Unterschiede im Reaktionsmuster der eingesetzten Antikörper weisen darauf hin, daß offensichtlich verschiedene Isoformen von bFGF erkannt werden, welche in den epithelialen Anteilen der Plazentome unterschiedliche Funktionen von bFGF widerspiegeln. Bei Verwendung

des monoklonalen Antikörpers, welcher ausschließlich die niedermolekularen Isoformen (16 bis 18 kDa) von bFGF erkennt, fallen die überwiegend zytosolischen Reaktionen der epithelialen Plazentomanteile auf, während der polyklonale Antikörper durch seine schwachen bis intensiven nukleären Reaktionen auffällt. Verschiedene Untersuchungen belegen, daß innerhalb der Zellen die nieder- und hochmolekularen Isoformen von bFGF in unterschiedlichen Zellkompartimenten gelagert werden. Die kleineren bFGF-Isoformen werden hauptsächlich im Zytosol gelagert bzw. exportiert und auf der Zelloberfläche gelagert, während die größeren bFGF-Isoformen nukleär nachweisbar sind (BUGLER et al., 1991; FLORKIEWICZ et al., 1991). Die vorliegenden Ergebnisse legen das Erkennen höhermolekularer bFGF-Isoformen durch den polyklonalen Antikörper nahe; diese Vermutung bedarf allerdings einer weiteren Bestätigung.

Der polyklonale Antikörper zeigte insbesondere im Karunkelepithel mit zunehmender Trächtigkeitsdauer eine leichte Verstärkung des nukleären Signales, was auf eine zunehmende Bedeutung der erkannten bFGF-Isoform schließen läßt. Dieses Signal verlief der Tendenz nach parallel zu den Veränderungen des Karunkelepithels. Die zu Beginn der Trächtigkeit zunächst hochprismatischen Zellen des Karunkelepithels verändern mit fortschreitender Trächtigkeit ihre Form und werden zunächst kubisch, bis sie im letzten Trächtigkeitsstadium abgeflacht sind und deutliche Degenerationerscheinungen aufweisen (BJÖRKMAN, 1954; WOICKE et al., 1986). Diese histomorphologischen Veränderungen werden als Reifungsprozesse der Plazenta interpretiert und dienen in Vorbereitung auf die Geburt insbesondere dem physiologischen Abgang der Nachgeburt (WOICKE et al., 1986). Die über die zweite Hälfte der Trächtigkeit nahezu gleichbleibend hohe Proliferationsrate der Zellen des Karunkelepithels (SCHULER et al., 2000) legt die Vermutung nahe, daß die Abflachung des Epithels nicht im Sinne einer Auflösung zu verstehen ist, sondern ein Zeichen für die differenzierte Funktion dieser Zellen gewertet werden kann. Die Auflösung des Epithels würde durch fortschreitende Degeneration der Zellen ohne Proliferation erfolgen. Die kontinuierliche Proliferation des Karunkelepithels ohne sichtbaren Gewebezuwachs läßt auf eine Art „Zellmauser“ schließen, bei der es zur Degeneration von Zellen kommt, wobei die dabei erhaltenen Nährstoffe zur Bildung neuer Zellen genutzt werden können (SCHULER et al., 2000).

Die nach Anwendung des monoklonalen Antikörpers (Erkennung der niedermolekularen bFGF-Isoformen) im Karunkelepithel auftretenden zytosolischen Signale zeigen dagegen ein völlig anderes Bild. Hier tritt in den untersuchten Stadien ein von der Intensität her eher gleichbleibendes Signal auf, welches an den Tagen 150 und 240 in allen Zellen, am Tag 270 nur noch in vielen Zellen, am Tag 220 dagegen nur in einzelnen Zellen auftritt. Die Reduktion des Signales am Tag 220 könnte gegebenenfalls mit der verminderten Proliferation des Karunkelepithels zu diesem Zeitpunkt (SCHULER et al., 2000) in Verbindung gebracht werden; allerdings lassen die Reaktionen an den übrigen Stadien keinen Bezug zur Proliferation erkennen. Daher erscheint es wahrscheinlicher, daß die detektierten bFGF-Isoformen nicht vorrangig die Proliferation des Karunkelepithels beeinflussen, sondern eher nicht-mitogene Funktionen ausüben. Diese Folgerung legt auch ein Vergleich der Reaktionen des Trophoblasten an den verschiedenen Trächtigkeitsstadien nach Anwendung des monoklonalen Antikörpers nahe; dieser war als zytosolisches Signal nur in den kleinen, unreifen – also noch nicht ausdifferenzierten – BNC vorhanden, während die ausdifferenzierten großen BNC negativ blieben. Beim polyklonalen Antikörper dagegen reagierten die unterschiedlichen Entwicklungs- und Differenzierungsstadien der BNC gleichartig (siehe Kapitel: 4.1.2, Tabelle 5, Seite 85). Dies weist möglicherweise auf unterschiedliche Funktionen der dargestellten bFGF-Isoformen hin, obwohl PASUMARTHI et al. (1996) an Kardiomyozyten neonataler Ratten zeigten, daß sowohl hochmolekulare als auch niedermolekulare bFGF-Isoformen parakrine Effekte auf die Zellproliferation haben; die Überexpression der hochmolekularen Isoformen war dabei mit einem signifikanten Anstieg der Binukleation dieser Zellen verbunden. Das Auftreten von mehrkernigen Zellen in der Rinderplazenta ist auf die BNC des Trophoblasten beschränkt. Weder der Ursprung der BNC noch die Funktion der Bi- bzw. Multinukleation dieser Zellen sind bisher hinreichend geklärt (siehe Kapitel: 2.1.1, Seite 9). Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von bFGF und der Bildung von mehrkernigen Zellen ist möglich; die mitogene Wirkung von bFGF führt zur Stimulation der Zellteilung – und damit auch zur Kernteilung. Differenzierte Zellen, die nicht zur vollständigen Zellteilung fähig sind, reagieren auf die Zugabe von bFGF unter Umständen mit einer unvollständigen Teilung, die in Bi- bzw. Multinukleation dieser Zellen resultiert (KRIZ et al., 1995).

Bei Betrachtung der biologischen Bedeutung von bFGF fallen noch weitere Aspekte auf. Die vielfältigen Interaktionen von bFGF mit Hormonen – insbesondere mit Steroiden – wurden in zahlreichen Publikationen beschrieben (BAIRD und BÖHLEN, 1990; HURWITZ et al., 1990; STIRLING et al., 1991; CARLONE und RIDER, 1993; VERNON und SPICER, 1994; LIEBERMANN et al., 1996). Diese Untersuchungen beschränken sich zwar auf die Wechselwirkungen zwischen bFGF und Hormonen in den Keimdrüsen, dennoch ist anzunehmen, daß auch in der Plazenta, einem temporär endokrinen Organ, ähnliche Wechselwirkungen auftreten. Auffallend ist die Reduktion der Signalintensität und Signalausbreitung um Tag 220 der Gravidität. Zu diesem Zeitpunkt – etwa vom 180. bis 240. Tag der Gravidität – ist auch plazentares Progesteron in der Lage, beim Rind die Gravidität aufrechtzuerhalten; ab Tag 240/250 verliert die Plazenta diese Funktion wieder (HOFFMANN, 1994). Durch den Nachweis der Expression des Progesteron- und Estrogenrezeptors im maternalen Teil des Plazentoms (SCHULER et al., 1999) wurde erstmals der Hinweis erbracht, daß plazentar gebildeten Steroiden beim Rind wahrscheinlich eine parakrine Funktion zukommt. Es ist daher möglich, daß bFGF in den Rinderplazentomen die Bildung von Sexualhormonen beeinflusst; eine These, die allerdings der weiteren Untermauerung bedarf

5.2.3 Immunhistologischer Nachweis des FGF-Rezeptors (FGF-R)

Aus methodischer Sicht war die Darstellung des FGF-Rezeptors nicht unproblematisch, da von den verwendeten fünf Kontrollantikörpern lediglich einer die Spezifität des immunhistologischen Signales belegte. Nachdem aus methodischen Aspekten dafür eine plausible Erklärung gegeben werden konnte (siehe Kapitel: 5.1.5, Seite 119) und auch der Nachweis der beiden Wachstumsfaktoren aFGF und bFGF in den Plazentomen die Expression eines FGF-R nicht nur sinnvoll, sondern auch wahrscheinlich erscheinen läßt, kann von einer Spezifität der erhaltenen Ergebnisse ausgegangen werden, da die auto- und parakrinen Wirkungen dieser beiden Wachstumsfaktoren von extrazellulären Interaktionen mit den spezifischen Rezeptoren abhängig sind (HICKS et al., 1996).

Während die erfaßte Expression von FGF-R relativ gut mit den Ergebnissen zum Vorkommen von aFGF und bFGF im maternalen und fetalen Stroma übereinstimmt, ergibt sich für den Trophoblasten lediglich bei Verwendung des monoklonalen

Antikörpers eine Übereinstimmung. Die größte Diskrepanz ergibt sich für die Befunde im Karunkel-epithel. Diese Situation spiegelt wahrscheinlich die differenzierten Rezeptor-Ligand-Erkennungsprofile der einzelnen FGF-Faktoren wider: aFGF und bFGF sind in der Lage mehrere funktionelle Isoformen des FGF-R zu binden, auch die einzelnen Isoformen von FGF-R 1 und FGF-R 2 sind in der Lage, mehrere FGF-Liganden zu binden. Da der in dieser Studie verwendete Antikörper nicht nur den FGF-R 1 erkennt, sondern auch eine Kreuzreaktivität zum FGF-R 2 zeigt, ist es hier letztendlich nicht möglich, eindeutig zu entscheiden, welcher FGF-R (FGF-R 1 oder FGF-R 2) in den einzelnen histologischen Präparaten jeweils exprimiert wurde.

Da bisher keine Informationen darüber vorliegen, welcher FGF-R in Rinderplazentomen exprimiert wird, ist es auch nicht möglich, das erhaltene Reaktionssignal auf die Erkennung des FGF-R 1 zurückzuführen; es kann auch durch die Erkennung des FGF-R 2 hervorgerufen worden sein.

Um eindeutige Aussagen über die Verteilung der FGF-R und die Zusammenhänge zur Expression der einzelnen Mitglieder der FGF-Polypeptid-Familie machen zu können, sind daher weitere Untersuchungen notwendig. Dabei sollten sowohl selektive Antikörper gegen die einzelnen Rezeptor-Isoformen und die verschiedenen Liganden als auch weitere biochemische Verfahren zur quantitativen Bestimmung angewendet werden.

5.2.4 Immunhistologischer Nachweis des EGF-Rezeptors (EGF-R)

In den eigenen Untersuchungen konnte der EGF-R in allen untersuchten Trächtigkeitsstadien nachgewiesen werden, wobei das membranständige (parazelluläre) Signal im Bereich der fetomaternalen Kontaktzone besonders auffällig war (siehe Kapitel: 4.2.2 und Anhang Tabelle 15). Hier wird die Erkennung einer extrazellulären Domäne des Rezeptors durch den Antikörper deutlich. Die in allen anderen Zellpopulationen auftretenden schwachen bis deutlichen zytosolischen bzw. nukleären Reaktionen erklären sich weitestgehend durch den Lebenszyklus dieses Rezeptors, welcher nach seiner Biosynthese und Reifung in verschiedenen Zellorganellen auf der Zelloberfläche exprimiert und im Anschluß an die Ligandbindung durch Endozytose wieder in die Zelle aufgenommen wird; dort durchlaufen Rezeptor und Ligand verschiedene Zellkompartimente, bis sie

letztendlich in Lysosomen abgebaut werden bzw. einige Rezeptoren an die Zellmembran rezirkulieren (CARPENTER und WAHL, 1990). Das bedeutet, daß der EGF-R in allen Zellkompartimenten auftreten und dort dann auch immunhistologisch nachweisbar sein kann.

Die vielfältigen Untersuchungen zum Vorkommen des EGF-R in der humanen Plazenta zeigen zwar teilweise widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der zeitlichen Expression und der Lokalisation des EGF-R in bzw. an den Zellen, stimmen aber dahingehend überein, daß der EGF-R und seine Liganden im Trophoblast-Gewebe – also im fetalen Epithel – exprimiert werden (MARUO und MOCHIZUKI, 1987; KAWAGOE et al., 1990; MÜHLHAUSER et al., 1993; DUELLO et al., 1994). In den eigenen Untersuchungen dagegen wurde der EGF-R überwiegend auf der Zelloberfläche des Karunkelepithels, also im maternalen Gewebe, exprimiert. Bei dem Vergleich zwischen Mensch und Rind ist allerdings Vorsicht geboten, da auf Grund der andersartigen Plazentation das Karunkelepithel beim Menschen nicht mehr vorhanden ist und dadurch andere histo-morphologische Eigenschaften vorliegen. Der beim Rind beobachtete Verlust des Signals unter der Geburt kann mit der fortschreitenden Abflachung bis zur Degeneration des Karunkelepithels erklärt werden.

Generell kann die Expression des EGF-R in der bovinen Plazenta mit der Funktion dieses Rezeptors gut erklärt werden. Der EGF-R wird auf auto-, para-, und juxtakrinem Wege durch die Bindung eines Liganden (TGF- α , EGF, Amphiregulin, Neuregulin 1 und 2, Heparin-binding EGF-like growth faktor, Betacellulin) aktiviert (ANKLESARIA et al., 1990; LADINES-LLAVE et al., 1993; FILLA und KAUL, 1997), was die Autophosphorylierung des Rezeptors nach sich zieht. Je nach Ligand und Rezeptor-Subtyp kommt es im Folgenden zur Aktivierung verschiedener „second-messenger-Systeme“, zur Stimulation der zellulären Transportsysteme (KLEINSTEIN et al., 1993), zur Induktion spezifischer mRNA oder zur DNA-Synthese (MÜHLHAUSER et al., 1993). Diese Vorgänge resultieren schließlich in der Zellproliferation oder Zelldifferenzierung von Epithelien und epidermalen Zellen (WEIMANN und KIESS, 1995). Inwieweit der in vorliegender Untersuchung detektierte EGF-R die Proliferation oder die Zelldifferenzierung reguliert, muß offen bleiben, da weder bekannt ist welcher Rezeptor-Subtyp in den Rinderplazentomen auftritt noch welche Liganden in welchem Umfang zu den einzelnen Stadien

vorhanden sind. Dennoch kann auch hier ein Zusammenhang zur Proliferation angenommen werden. Wie die Untersuchungen zur Proliferation der Plazentome ergeben haben (SCHULER et al., 2000), wurden im Karunkel epithel die höchsten Proliferationsraten gemessen, wobei – verglichen mit den Werten von Tag 150 und 270 - ein Rückgang der Proliferationsrate an den Tagen 220 und 240 der Trächtigkeit beobachtet wurde. Genau zu diesen Trächtigkeitstagen trat das immunhistologische Signal der EGF-R-Färbung nur sporadisch an einzelnen oder mehreren benachbarten Zellen auf, während an Tag 150 und Tag 270 in einzelnen Präparaten massive EGF-R-Signale erkennbar waren. Warum die Präparate dieser Stadien kein einheitliches Reaktionsmuster aufweisen (siehe Kapitel: 4.2.2, Seite 104 und Anhang Tabelle 15), kann möglicherweise mit der Halbwertszeit des Rezeptors erklärt werden. Untersuchungen an menschlichen Fibroblasten haben gezeigt, daß die Halbwertszeit des EGF-R annähernd zehn Stunden beträgt, in Anwesenheit des Liganden EGF allerdings auf eine Stunde reduziert wird (Sigma, Produktinformation im Datenblatt des verwendeten EGF-R-Antikörpers). Da nach Ligandbindung der EGF-R internalisiert und größtenteils abgebaut wird (CARPENTER und WAHL, 1990), ist es durchaus möglich, daß die einzelnen Plazentome der Tage 150 und 270 unterschiedliche EGF-Konzentrationen widerspiegeln: Eine massive Rezeptorexpression vor der Sekretion von EGF wäre biologisch sinnvoll und würde sich in der Immunhistologie mit einem massiven membranständigen Signal manifestieren. Die Präparate ohne das typische parazelluläre/membranständige Signal (siehe Anhang Tabelle 15: Rd 22, Rd 23, Rd 18, Rd 24) könnten die Situation nach der Ligandbindung und Internalisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes zeigen. Letzteres würde auch die deutliche zytosolische Reaktion des Karunkel epithels erklären. Nicht ausgeschlossen ist auch, daß bei der Gewinnung dieser Präparate die Phase der Rezeptorbiosynthese noch nicht abgeschlossen war (siehe Kapitel: 4.2.2 Tabelle 9, Tabelle 10 und Anhang Tabelle 15).

Nachdem der EGF-Rezeptor im Uterus, Eileiter und Ovar zyklischer Rinder (PÖHLAND und TIEMANN, 1994), in der frühen Trächtigkeit auf dem Trophoblasten des Schafes (GHARIB-HAMOUCHE et al., 1993) und dem Trophoblasten des Menschen (DUELLO et al., 1994; TAGA et al., 1995) nachgewiesen wurde, erscheint die Expression in den Plazentomen von Rindern mehr als nur wahrscheinlich. Auch die differenzierten Wechselbeziehungen zwischen EGF/EGF-R und Steroiden/Steroidrezeptoren (siehe Kapitel: 2.3.2, Seite: 41) sprechen für die

Expression des EGF-R in den untersuchten Plazentomen. So ist bekannt, daß die estrogeninduzierten Wachstums- und Differenzierungsprozesse im Endometrium des Menschen durch EGF vermittelt werden (KLEINSTEIN et al., 1993). Die Wirkung von EGF kann nur über die Bindung dieses Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor - den EGF-R - vermittelt werden.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Untersuchung war es, die Expression und Verteilung der Wachstumsfaktoren aFGF, bFGF, TGF- α und ihrer Rezeptoren FGF-Rezeptor und EGF-Rezeptor in Plazentomen von Rindern in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Gravidität sowie der Geburt zu erfassen.

Plazentome wurden von jeweils drei 150, 220, 240 und 270 Tage tragenden Kühen, sowie von drei Geburtstieren, bei denen eine Sectio caesarea durchgeführt worden war, gewonnen, formalinfixiert und paraffineingebettet.

Die eingesetzten immunhistochemischen Nachweisverfahren unter Verwendung von biotinylierten Sekundärantikörpern und der ABC-Methode erwiesen sich bei Auswahl geeigneter Reagenzien und Versuchsprotokolle zum Nachweis von aFGF, bFGF, FGF-Rezeptor und EGF-Rezeptor als geeignet. Dabei mußten, um unspezifische Färbereaktionen eindeutig von spezifischen Reaktionen abgrenzen zu können, bei jedem Versuch geeignete Positiv- bzw. Negativkontrollen (Isotypenkontrollen der Antikörper, Einsatz von definierten Positiv- bzw. Negativkontrollen) herangezogen werden. Um weiterhin Einflüsse auf den Ablauf der immunhistochemischen Nachweisreaktion und deren Bewertung so gering wie möglich zu halten, wurden alle Versuche unter gleichen Rahmenbedingungen von einer Person durchgeführt.

Ein geeignetes Versuchsprotokoll zum spezifischen Nachweis von TGF- α konnte nicht entwickelt werden.

Der Wachstumsfaktor aFGF konnte unabhängig vom Trächtigkeitsstadium bei weitgehend einheitlichem Färbemuster in allen untersuchten Präparaten in allen Zellpopulationen nachgewiesen werden. Die Funktion von aFGF im Plazentom wird daher weniger im Hinblick auf seine mitogenen Wirkungen, sondern eher im Zusammenhang mit seinen nicht-mitogenen Wirkungen (zelluläre Differenzierung, Beeinflussung des zellulären Stoffwechsels und der Zellmigration) gesehen.

Auch der Wachstumsfaktor bFGF konnte mit Hilfe von zwei verschiedenen Antikörpern in den untersuchten Plazentomen zweifelsfrei nachgewiesen werden, wobei sich die Reaktionsmuster der eingesetzten Antikörper hauptsächlich durch ihre Reaktionen in den epithelialen Anteilen unterschieden. Während bei beiden Antikörpern die Stromaanteile in allen untersuchten Stadien schwache bis intensive

nukleäre Signale zeigten, reagierte der monoklonale Antikörper in den epithelialen Anteilen überwiegend zytosolisch, der polyklonale Antikörper zeigte dagegen neben schwachen zytosolischen Signalen auch schwache bis intensive nukleäre Reaktionen. Auffallend ist die Reduktion der Immunreaktion am Tag 220, die bei beiden Antikörpern zu beobachten war. Die Reaktionen des Stromas werden im direktem Zusammenhang mit proliferativen Prozessen und der Förderung der Angiogenese gesehen, während die epithelialen Reaktionen mehr als Ausdruck nicht-mitogener Wirkungen (Differenzierung, Modulation der Proteinbiosynthese und –sekretion) des bFGF interpretiert werden. Die unterschiedlichen Reaktionen der eingesetzten Antikörper können durch das Erkennen unterschiedlicher bFGF-Isoformen erklärt werden.

Auch die Expression eines Wachstumsfaktor-Rezeptors FGF-R in den Rinderplazentomen konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, wobei die Signalintensität und Signalausbreitung in Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstadium variierten. Das maternale Stroma zeigte ein schwaches bis intensives Signal der äußeren Zellmembran bzw. des Zytosols der Stromazellen, wobei an den Tagen 220, 240 und unter der Geburt die Anzahl der betroffenen Zellen höher war als an den Tagen 150 und 270. Alle untersuchten Stadien zeigten im fetalen Stroma ein nukleäres und perinukleäres Signal, welches am Tag 150 sehr schwach bis schwach war, mit zunehmender Trächtigkeit stärker wurde und ab Tag 240 bis zur Geburt schwach bis deutlich ausgeprägt war. Das Karunkel epithel wies ein schwaches zytosolisches und überlappend schwaches nukleäres Signal auf, welches an Tag 240 in vielen Zellen und an Tag 270 nur noch in einigen Zellen nachweisbar war, wobei in den Präparaten auch vollständig negative Regionen auffielen. Die beiden Zelltypen des Trophoblasten (BNC und Uninukleäre) reagierten einheitlich mit einem parazellulären und membranständigen bzw. zytosolischen Signal, welches an den Tagen 150, 220, 270 in vielen Zellen, an Tag 240 und unter der Geburt in nahezu allen Zellen auftrat. An Tag 220 fiel zusätzlich ein schwaches nukleäres Signal einzelner Zellen auf, hier waren die Signale besonders in der Nähe großer Stromastraßen zu finden. Eine Differenzierung zwischen FGF-Rezeptor 1 und FGF-Rezeptor 2 war allerdings nicht möglich.

Ebenso konnte die Expression des Wachstumsfaktor-Rezeptors EGF-R nachgewiesen werden, wobei das immunhistologische Signal weitestgehend auf die

epithelialen Plazentomanteile beschränkt war. Die Signalintensität und -ausbreitung variierte dabei nicht nur in Abhängigkeit vom Trächtigkeitsstadium sondern zeigte auch große Schwankungen zwischen den Tieren des gleichen Stadiums. Letztere spiegeln möglicherweise unterschiedliche Ligandkonzentrationen in den jeweiligen Präparaten wider. Der Verlust des Signals unter der Geburt erklärt sich aus der fortschreitenden Degeneration des maternalen Karunkelepithels; der Verlust der Signalintensität am Tag 220 entspricht den Beobachtungen bei bFGF.

Zusammenfassend ergibt sich, daß die Wachstumsfaktoren aFGF und bFGF sowie die Wachstumsfaktor-Rezeptoren FGF-R und EGF-R in der zweiten Hälfte der Gravidität und/oder unter der Geburt in den Plazentomen von Rindern exprimiert werden. Damit kann die Bedeutung dieser Faktoren für die Entwicklung und Funktion der Rinderplazenta als belegt angesehen werden.

7 Summary

This study examines the expression and the distribution of the growth factors aFGF, bFGF and TGF- α and their receptors FGF-R and EGF-R during the second half of pregnancy and throughout parturition. Placentomes were collected from cows at days 150, 220, 240 and 270 of pregnancy and from normal-term placentas, these latter extracted by caesarean section. Each group consisted of three animals. After removal placentomes were fixed in formalin and embedded in paraffin.

As long as the right reagents and pre-treatments of the probes were chosen, the immunohistochemical technique using biotinylated secondary antibodies and the ABC-complex was the appropriate one for detecting aFGF, bFGF, FGF-R and EGF-R, although controls were essential in order to distinguish between specific and non-specific immunolabelling (isotypic control of antibodies, known positive/negative tissues). To reduce extraneous influences on the immunolabelling, all tests were prepared by myself under the same conditions.

In this investigation specific detection of TGF- α was not possible.

Immunolabelling of aFGF did not depend on the stage of pregnancy, but resulted in nearly the same staining pattern in each probe and detected the growth factor in each cell type. It seems that in bovine placentomes aFGF does not act as a mitogen, but activates non-mitogenic cell functions (cellular differentiation, modulation of cellular metabolism, and cellular motility and migration).

The growth factor bFGF was detected in bovine placentomes by two different antibodies, which gave different staining patterns. While the monoclonal antibody showed cytoplasmic immunostaining of epithelial cells, the polyclonal antibody located weak to intense immunostaining of the nuclei, concurrent with weak cytoplasmic reaction in these cells. Additionally, both antibodies were immunoreactive in nuclei of stromal cells and showed a reduction of immunoreactivity at day 220. Stromal reactions of bovine placentomes indicate that bFGF stimulates cell proliferation and angiogenesis, while epithelial reactions are connected with non-mitogenic cell functions (changes in differentiated cell function, modulation of specific cellular protein synthesis). The different staining patterns could be due to the recognition of different isoforms of bFGF.

The present study detected the expression of FGF-R in bovine placentomes during the second half of pregnancy to parturition and proved that the staining pattern varied according to the different stages of pregnancy. Outer membranes and cytoplasm of the maternal stromal cells stained with a weak to intensive signal, while on days 220, 240 and at parturition the number of positive cells was higher than on days 150 and 270. At each investigated stage of pregnancy foetal stromal cells had nuclear and perinuclear immunostaining, which started with extra-weak to weak reaction on day 150, became stronger as pregnancy progressed and ended with weak to strong reactions from day 240 to parturition. Cytoplasmic signals of the caruncular epithelium cells were weak and overlapped with weak reaction of the nuclei; on day 240 many cells reacted positive while on day 270 only a few cells stained. Remarkably, some parts of the probes were absolutely negative. The two trophoblastic cell types (BNC and columnar trophoblastic cells) reacted in the same way to positive cell membranes or cytoplasm; on days 150, 220 and 270 many cells stained, while on day 240 and at parturition almost all cells were positive. Additionally, there was a weak nuclear signal of single cells on day 220. This latter signal was most commonly found beside greater stromal areas. There is no possibility of differentiation between FGF-R 1 and FGF-R 2.

EGF-R expression was also detected, whereas the staining reaction was restricted to the epithelial parts of placentomes. Intensity and distribution of the signals did not vary only according to the stage of pregnancy but also between different animals at the same stage of pregnancy. This probably reflects the different concentrations of EGF-R/ligand in the individual specimen. The loss of signals in at-term placentomes can be explained by the progressive degeneration of the caruncular epithelium, while loss of signals on day 220 corresponds to the observations at bFGF.

In conclusion, during the second half of gestation and under parturition the growth factors aFGF and bFGF, as well as their receptors FGF-R and EGF-R, are expressed in bovine placentomes. Therefore, these proteins are important for the development and function of bovine placentomes.

8 Literaturverzeichnis

ADACHI, K.; KURACHI, H.; HOMMA, H.; ADACHI, H.; IMAI, T.; SAKATA, M.; HIGASHIGUCHI, O.; YAMAGUCHI, M.; MORISHIGE, K.-I.; SAKOYAMA, Y.; MIYAKE, A. (1995)

Estrogen induces epidermal growth factor (EGF) receptor and its ligands in human fallopian tube: Involvement of EGF but not transforming growth factor- α in estrogen-induced tubal cell growth in vitro
Endocrinology 136; 2110 - 2119

AMALRIC, F.; BOUCHE, G.; BONNET, H.; BRETHENOU, P.; ROMAN, A.M.; TRUCHET, I.; QUARTO, N. (1994)

Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in the nucleus: translocation process and targets
Biochemical Pharmacology 47; 111 - 115

ANKLESARIA, P.; TEIXIDÓ, J.; LAIHO, M.; PIERCE, J.H.; GREENBERGER, J.S.; MASSAGUÉ, J. (1990)

Cell-cell adhesion mediated by binding of membrane-anchored transforming growth factor α to epidermal growth factor receptors promotes cell proliferation
Proceedings of the National Academy of Science of the USA 87; 3289 - 3293

ASHTON, A.W.; DAWES, J.; CHESTERMAN, C.N. (1995)

Acidic and basic fibroblast growth factors have comparable effects on the haemostatic function of vascular endothelium
Growth Factors 12; 111 - 120

ATKINSON, B.A.; KING, G.J.; AMOROSO, E.C. (1984)

Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium
Biology of Reproduction 30; 763 - 774

BAFFOUR, R.; BERMAN, J.; GARB, J.L.; RHEE, S.W.; KAUFMAN, J.; FRIEDMANN, P. (1992)

Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic FGF in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic FGF
Journal of Vascular Surgery 16; 181 - 191

BAIRD, A.; BÖHLEN, P. (1990)

Fibroblast Growth Factors
In: Peptide Growth Factors and their Receptors II; Handbuch Exp. Pharm. 95/I; Editors: M.B. Sporn, Springer-Verlag 1990; Berlin, Heidelberg, NY; 369 - 418

BAIRD, A.; ESCH, F.; GOSPODAROWICZ, D.; GUILLEMIN, R. (1985)

Retina- and eye-derived endothelial cell growth factors: partial molecular characterization and identity with acidic and basic fibroblast growth factors
Biochemistry 24; 7855 - 7860

- BALDIN, V.; ROMAN, A.M.; BOSC-BIERNE, I.; AMALRIC, F.; BOUCHE, G. (1990)
Translocation of bFGF to the nucleus is G1 phase cell cycle specific in bovine aortic endothelial cells
EMBO Journal 9; 1511 - 1517
- BASELGA, J.; MENDELSON, J.; KIM, Y.M.; PANDIELLA, A. (1996)
Autocrine regulation of membrane transforming growth factor- α cleavage
Journal of Biological Chemistry 271; 3297 - 3284
- BASILICO, C.; MOSCATELLI, D. (1992)
The FGF family of growth factors and oncogenes.
Advances in Cancer Research 59; 115 - 165
- BECKMANN, M.W.; TUTSCHEK, B.; GOHRING, U.J.; ENGELS, K.; PICARD, F.K.; SCHARL, A.; NIEDERACHER, D.; SCHNURCH, H.G. (1995)
Immunohistochemical detection of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in paraffin sections of breast carcinoma tissue: correlation and clinical significance
Geburtshilfe Frauenheilkunde 55; 258 – 265
- BEESLEY, J.E. (1995)
Immunocytochemical avenues
In: Immunocytochemistry, A practical approach; Ed.: J.E. Beesley; IRL Press at Oxford University Press; 7 – 13
- BISSONNETTE, F.; COOK, C.; GEOGHEGAN, T.; STEFFEN, M.; HENRY, J.; YUSSMAN, M.A.; SCHULTZ, G. (1992)
Transforming growth factor- α and epidermal growth factor messenger ribonucleic acid and protein levels in human placentas from early, mid and late gestation
American Journal of Obstetrics and Gynecology 166 (1 Pt 1); 192 - 199
- BJÖRKMAN, N. (1954)
Morphological and histochemical studies on bovine placenta
Acta Anatomica, Suppl.: 22-2AD, Vol.: XXII
- BJORGE, J.D.; KUDLOW, J.E. (1987)
Epidermal growth factor receptor synthesis is stimulated by phorbol ester and epidermal growth factor. Evidence for a common mechanism.
Journal of Biological Chemistry 262; 6615 - 6622
- BÖHLEN, P.; BAIRD, A.; ESCH, F.; LING, N.; GOSPODAROWICZ, D. (1984)
Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor
Proceedings of the National Academy of Science of the USA 81; 5364 - 5368
- BOENISCH, T. (1989)
In: Handbuch II immunchemischer Färbemethoden
Ed.: Dr. Sally Naish, DAKO Corporation, Carpinteria, Kalifornien, USA; 9 – 33

- BOOMSMA, R.A.; MAVROGIANIS, P.A.; VERHAGE, H.G. (1997)
Immunocytochemical localization of transforming growth factor and epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in the cat endometrium and placenta
Histochemical Journal 29; 495 - 504
- BOURNE, J. (1989)
Handbuch I der Immunperoxidase Färbemethoden
DAKO Corporation, Carpinteria, Kalifornien, USA; 7 – 37
- BRADSHAW, R.A.; CAVANAUGH, K.P. (1990)
Isolation and characterization of growth factors
In: Peptide Growth Factors and their Receptors II; Handbuch Exp. Pharm. 95/I; Editors: M.B. Sporn, Springer-Verlag 1990; Berlin, Heidelberg, NY; 17 - 36
- BRADSHAW, R.A.; PRENTIS, S. (1987)
Oncogenes and growth factors
In: Oncogenes and growth factors R.A. Bradshaw und S. Prentis (Hrsg.) Elsevier Science Publishers Amsterdam-New York-Oxford, 1 - 306
- BRIGHT, N.A.; OCKLEFORD, C.D.; ANWAR, M. (1994)
Ontogeny and distribution of Fc gamma receptors in the human placenta. Transport or immune surveillance?
Journal of Anatomy 184; 297 - 308
- BUGLER, B.; AMALRIC, F.; PRATS, H. (1991)
Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor
Molecular and Cellular Biology 11; 573 - 577
- BUNTROCK, P.; JENTZSCH, K.D.; HEDER, G. (1982)
Stimulation of woundhealing using brain extract with fibroblast growth factor activity. II. Histological and morphometric examination of cells and capillaries.
Experimental Pathology 21, 46 - 67
- BUSH, M.R.; MELE, J.M.; COUCHMAN, G.M., WALMER, D.K. (1998)
Evidence of juxtacrine signaling for transforming growth factor-alpha in human endometrium
Biology of Reproduction 59; 1522 - 1529
- CAO, H.; LEI, Z.M.; BIAN, L.; RAO, CH.V. (1995)
Functional nuclear epidermal growth factor receptors in human choriocarcinoma JEG-3 cells and normal human placenta
Endocrinology 136; 3163 – 3172
- CARLONE, D.L.; RIDER, V. (1993)
Embryonic modulation of basic fibroblast growth factor in the rat uterus
Biology of Reproduction 49; 653 – 665

- CARPENTER, G.; WAHL, M.I. (1990)
The Epidermal Growth Factor Family
In: Peptide Growth Factors and their Receptors II; Handbuch Exp. Pharm.
95/I; Editors: M.B. Sporn, Springer-Verlag 1990; Berlin, Heidelberg, NY;
69 - 171
- CARRAWAY, K.L.; CANTLEY, L.C. (1994)
A new acquaintance for erbB 3 and erbB 4: a role for receptor
heterodimerization in growth signaling
Cell 78: 5 – 8
- CATTINI, P.A.; NICKEL, B.; BOCK, M.; KARDAMI, E. (1991)
Immunolocalization of basic fibroblast growth factor (bFGF) in growing and
growth-inhibited placental cells: a possible role for bFGF in placental cell
development
Placenta 12; 341 – 352
- CHRISTENSEN, M.E.; POULSEN, S.S. (1996)
Immunolocalization of transforming growth factor alpha in normal human
tissues
Histochemistry and Cell Biology 105; 391 - 400
- COHEN, S. (1986)
Nobel Lecture: Epidermal growth factor
Bioscience Reports 6; 1017 – 1028
- COULIER, F.; PONTAROTTI, P.; ROUBIN, R.; HARTUNG, H.; GOLDFARB, M.;
BIRNBAUM, D. (1997)
Of worms and men: an evolutionary perspective on the fibroblast growth factor
(FGF) and FGF receptor families
Journal of Molecular Evolution 44; 43 - 56
- CROTEAU, S.; MENEZO, Y.; BENKHALIFA, M. (1995)
Transforming growth factors α and β expression in fertilized and
parthenogenetic pre-implantation mouse embryos: RNA detection with
fluorescent in situ hybridization
Development, Growth and Differentiation 37; 433 - 440
- CZECH, M.P.; CLAIRMONT, K.B.; YAGALOFF, K.A.; CORVERA, S. (1990)
Properties and regulation of receptors for growth factors
In: Peptide Growth Factors and their Receptors II; Handbuch Exp. Pharm.
95/I; Editors: M.B. Sporn, Springer-Verlag 1990; Berlin, Heidelberg, NY;
37 - 65

- DAS, S.K.; TSUKAMURA, H.; PARIA, B.C.; ANDREWS, G.K.; DEY, S.K. (1994)
Differential expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) gene and regulation of EGF-R bioactivity by progesterone and estrogen in the adult mouse uterus
Endocrinology 134; 971 - 981
- DAVIS, C.G. (1990)
The many faces of epidermal growth factor repeats
New Biologist 2; 410 - 419
- DAVIS, M.G.; ZHOU, M.; ALI, S.; COFFIN, J.D.; DOETSCHMAN, T.; DORN, G.W.; 2nd (1997)
Intracrine and autocrine effects of basic fibroblast growth factor in vascular smooth muscle cells
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 29; 1061 - 1070
- DeBELLIS, A.; GHIANDI, P.; COMERCI, A.; GRAPPONE, C.; MILANI, S.; SALERNO, R.; MARRA, F.; SERIO, M. (1996)
Epidermal growth factor, epidermal growth factor receptor, and transforming growth factor- α in human hyperplastic prostate tissue: expression and cellular localization
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 81; 4148 - 4154
- DeFAZIO, A.; CHIEW, Y.E.; McEVOY, M.; WATTS, C.K.; SUTHERLAND, R.L. (1997)
Antisense estrogen receptor RNA expression increases epidermal growth factor receptor gene expression in breast cancer cells
Cell Growth and Differentiation 8; 903 - 911
- DeLARCO, J.E.; TODARO, G.J. (1978)
Growth factors from murine sarcoma virus transformed cells
Proceedings of the National Academy of Science of the USA 75; 4001 - 4005
- DELL'ERA, P.; PRESTA, M.; RAGNOTTI, G. (1991)
Nuclear localization of endogenous basic fibroblast growth factor in cultured endothelial cells
Experimental Cell Research 192; 505 - 510
- DERYNCK, R. (1992)
The physiology of transforming growth factor- α
Advances in Cancer Research 58; 27 - 52
- DERYNCK, R.; GOEDDEL, D.V.; ULLRICH, A.; GUTTERMAN, J.U.; WILLIAMS, R.D.; BRINGMAN, T.S.; BERGER, W.H. (1987)
Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors α and β and the epidermal growth factor receptor by human tumors
Cancer Research 47; 707 - 712

- DI BLASIO, A.M.; CARNITI, C.; VIGANO, P.; FLORIO, P.; PETRAGLIA, F.; VIGNALI, M. (1997)
Basic fibroblast growth factor messenger ribonucleic acid levels in human placentas from normal and pathological pregnancies
Molecular Human Reproduction 3; 1119 – 1123
- DUAN, D.-S.; WERNER, S.; WILLIAMS, L.T. (1992)
A naturally occurring secreted form of fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 binds basic FGF in preference over acidic FGF
Journal of Biological Chemistry 267; 16076 – 16080
- DUELLO, TH.M.; BERTICS, P.J.; FULGHAM, D.L.; VAN ESS, P.J. (1994)
Localization of epidermal growth factor receptors in first- and third-trimester human placentas
The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 42; 907 – 915
- EARP, H.S.; DAWSON, T.; LI, X.; YU, H. (1995)
Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research
Breast Cancer Research and Treatment 35; 115 – 132
- EBINA, Y.; ARAKI, E.; TAIRA, M.; SHIMADA, F.; MORI, M.; CRAIK, C.S.; SIDDLE, K.; PIERCE, S.B.; ROTH, R.A.; RUTTER, W.J. (1987)
Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes the insulin- and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity
Proceedings of National Academy of Science of the USA 84; 704 – 708
- ESCH, F.; BAIRD, A.; LING, N.; UENO, N.; HILL, F.; DENOROY, L.; KLEPPER, R.; GOSPODAROWICZ, D.; BÖHLEN, P.; GUILLEMIN, R. (1985 a)
Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (bFGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF
Proceedings of the National Academy of Science of the USA 82; 6507 - 6511
- ESCH, F.; UENO, N.; BAIRD, A.; HILL, F.; DENOROY, L.; LING, N.; GOSPODAROWICZ, D.; GUILLEMIN, R. (1985 b)
Primary structure of bovine brain acidic fibroblast growth factor (FGF)
Biochemical and Biophysical Research Communications 133; 554 – 562
- FARMILO, A.J.; STEAD, R.H. (1989)
Fixierung in der Immunhistochemie
In: Handbuch II immunchemischer Färbemethoden
Ed.: Dr. Sally Naish, DAKO Corporation, Carpinteria, Kalifornien, USA; 34 - 40
- FENG, SH.; XU, J.; WANG, F.; KANN, M.; McKEEHAN, W.L. (1996)
Nuclear localization of a complex of fibroblast growth factor (FGF)-1 and an NH₂-terminal fragment of FGF receptor isoforms R4 and R1a in human liver cells
Biochimica et Biophysica Acta 1310; 67 – 73

- FERRIANI, R.A.; AHMED, A.; SHARKEY, A.; SMITH, S.K. (1994)
Colocalization of acidic and basic fibroblast growth factor (FGF) in human placenta and the cellular effects of bFGF in trophoblast cell line JEG-3
Growth Factors 10; 259 - 268
- FILLA, M.S.; KAUL, K.L.; (1997)
Relative expression of epidermal growth factor receptor in placental cytotrophoblasts and choriocarcinoma cell lines
Placenta 18; 17 – 27
- FLORKIEWICZ, R.Z.; BAIRD, A.; GONZALEZ, A.M. (1991)
Multiple forms of bFGF: differential nuclear and cell surface localization
Growth Factors 4; 265 - 275
- FLORKIEWICZ, R.Z.; MAJACK, R.A.; BUECHLER, R.D.; FLORKIEWICZ, E. (1995)
Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway
Journal of Cellular Physiology 162; 388 - 399
- FREY, H.-H. (1996)
Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie
In: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin; Ed.: Hans-Hasso Frey und Wolfgang Löscher, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart; 35 - 76
- GAUTSCHI-SOVA, P.; MÜLLER, T.; BÖHLEN, P. (1986)
Amino acid sequence of human acidic fibroblast growth factor
Biochemical and Biophysical Research Communications 140; 874 – 880
- GAUTSCHI-SOVA, P.; JIANG, Z.P.; FRATER-SCHRODER, M.; BÖHLEN, P. (1987)
Acidic fibroblast growth factor is present in nonneural tissue: isolation and chemical characterization from bovine kidney
Biochemistry 26; 5844 - 5847
- GENBACEV, O.; POWLIN, S.S.; MILLER, R.K. (1994)
Regulation of human extravillous trophoblast (EVT) cell differentiation and proliferation in vitro: role of epidermal growth factor
Trophoblast Research 8; 427 – 442
- GHARIB-HAMROUCHE, N.; CHENE, N.; GUILLOMOT, M.; MARTAL, J. (1993)
Localization and characterization of EGF/TGF- α receptors on peri-implantation trophoblast in sheep
Journal of Reproduction 98; 385 – 392
- GILLESPIE, L.L.; PATERNO, G.D.; MAHADEVAN, L.C.; SLACK, J.M. (1992)
Intracellular signalling pathways involved in mesoderm induction by FGF
Mechanisms of Development 38; 99 – 107

- GIMENEZ-GALLEGO, G.; RODKEY, J.; BENNETT, C.; RIOS-CANDELORE, M.; DiSALVO, J.; THOMAS, K. (1985)
Brain-derived acidic fibroblast growth factor: complete amino acid sequence and homologies
Science 230; 1385 - 1388
- GIUDICE, L.C.; SALEH, W. (1995)
Growth Factors in Reproduction
Trends in Endocrinology and Metabolism 6; 60 - 69
- GLOBUS, R.K.; PLOUET, J.; GOSPODAROWICZ, D. (1989)
Cultured bovine bone cells synthesize basic fibroblast growth factor and store it in their extracellular matrix
Endocrinology 124; 1539 - 1547
- GÖRITZ, F.; JEWGENOW, K.; MEYER, H.H.D. (1996)
Epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in the ovary of the domestic cat (*Felis catus*)
Journal of Reproduction and Fertility 106; 117 – 124
- GOLDFARB, M. (1990)
The fibroblast growth factor family
Cell and Growth Differentiation 1; 439 - 445
- GOLDFARB, M. (1996)
Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development
Cytokine and Growth Factor Reviews 7; 311 - 325
- GOSPODAROWICZ, D.; CHENG, J. (1986)
Heparin Protects Basic and Acidic FGF From Inactivation
Journal of Cellular Physiology 128; 475 – 484
- GOSPODAROWICZ, D.; CHENG, J.; LUI, G.M.; BAIRD, A.; BOHLENT, P. (1984)
Isolation of brain fibroblast growth factor by heparin-Sepharose affinity chromatography: identity with pituitary fibroblast growth factor
Proceedings of the National Academy of Science of the USA 81; 6963 - 6967
- GOSPODAROWICZ, D.; DELGADO, D.; VLODAVSKY, Y. (1980)
Permissive effect of the extracellular matrix on cell proliferation in vitro
Proceedings of the National Academy of Science of the USA 77; 4094 – 4098
- GOSPODAROWICZ, D.; MASSOGLIA, S.; CHENG, J.; FUJII, D.K. (1986a)
Effect of fibroblast growth factor and lipoproteins on the proliferation of endothelial cells derived from bovine adrenals cortex, brain cortex, and corpus luteum capillaries
Journal of Cellular Physiology 127; 121 - 136
- GOSPODAROWICZ, D.; NEUFELD, G.; SCHWEIGERER, L. (1986b)
Fibroblast growth factor
Molecular and Cellular Endocrinology 46; 187 - 204

- GROSS, T.S.; WILLIAMS, W.F. (1988a)
Bovine placental prostaglandin synthesis: principal cell synthesis as modulated by the binucleate cell
Biology of Reproduction 38; 1027 - 1034
- GROSS, T.S.; WILLIAMS, W.F. (1988b)
In-vitro steroidsynthesis by the placenta of cows in late gestation and at parturition
Journal of Reproduction and Fertility 83; 565 - 573
- GROSS, T.S.; WILLIAMS, W.F.; RUSSEK-COHEN, E. (1991)
Cellular changes in the peripartum bovine fetal placenta related to placental separation
Placenta 12; 27 – 35
- GROSSER, O. (1927)
Frühentwicklung, Eihautbildung und Placentation des Menschen und der Säugetiere
Bergmann, München
- GROTHER, C.; UNSICKER, K. (1989)
Immunocytochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine adrenal gland, ovary and pituitary
Journal of Histochemistry and Cytochemistry 37; 1877 – 1883
- GUALANDRIS, A.; URBINATI, C.; RUSNATI, M.; ZICHE, M.; PRESTA, M. (1994)
Interaction of high-molecular-weight basic fibroblast growth factor with endothelium: biological activity and intracellular fate of human recombinant Mr 24000 bFGF
Journal of Cellular Physiology 161; 149 - 159
- GUPTA, A.; BAZER, F.W.; JAEGER, L.A. (1997)
Immunolocalization of acidic and basic fibroblast growth factors in porcine uterine and conceptus tissues
Biology of Reproduction 5; 1527 – 1536
- HALEY, J.; WHITTLE, N.; BENNETT, P.; KINCHINGTON, D.; ULLRICH, A.; WATERFIELD, M.D. (1987)
The human EGF-R gene: structure of the 110 kb locus and identification of sequences regulating its transcription
Oncogene Research 1; 375 – 396
- HAMAI, Y.; FUJII, T.; YAMASHITA, T.; KOZUMA, S.; OKAI, T.; TAKETANI, Y. (1998)
Evidence for basic fibroblast growth factor as a crucial angiogenic growth factor, released from human trophoblasts during early gestation
Placenta 19; 149 – 155
- HAMMOND, J. (1927)
The physiology of reproduction in the cow
Cambridge University Press London

- HAWKER, J.R.; GRANGER, H.J. (1992)
Internalized basic fibroblast growth factor translocates to nuclei of venular endothelial cells
American Journal of Physiology 262; Pt 2, H 1525 - H 1537
- HEISERMAN, G.J.; GILL, G.N. (1988)
Epidermal growth factor receptor threonine and serine residues phosphorylated in vivo
Journal of Biological Chemistry 263; 13152 – 13158
- HICKS, K.K.; SHIN, J.T.; OPALENIK, S.R.; THOMPSON, J.A. (1996)
Molecular mechanisms of angiogenesis: experimental models define cellular trafficking of FGF-1
Puerto Rico Health Sciences Journal 15; 179 - 186
- HOFFMANN, B. (1994)
Gravidität, Geburt und Puerperium
In: Veterinärmedizinische Endokrinologie, Döcke F (Hrsg.), Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart; 76-91
- HOFFMANN, R.S. (1940)
The growth activating effect of extracts of adult and embryonic tissues of the rat on fibroblast colonies in culture
Growth 4; 361 - 376
- HOFFMANN, L.H.; WOODING, F.B.P. (1993)
Giant and binucleate trophoblast cells of mammals
The Journal of Experimental Zoology 266; 559 - 577
- HOFMANN, G.E.; SCOTT, R.T. (1995)
Epidermal growth factor, transforming growth factor- α , and their common receptor
Seminars in Reproductive Endocrinology 13; 109 – 119
- HOROWITZ, G.M.; SCOTT, R.T.; DREWS, M.R.; NAVOT, D.; HOFMANN, G.E. (1993)
Immunohistochemical localization of transforming growth factor- α in normal human endometrium, decidua and trophoblast
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 76; 786 - 792
- HURWITZ, R.; HERNANDEZ, E.R.; RESNICK, C.E.; PACKMAN, J.N.; PAYNE, D.W.; ADASHI, E.Y. (1990)
Basic fibroblast growth factor inhibits gonadotropin-supported ovarian androgen biosynthesis: Mechanism(s) and site(s) of action
Endocrinology 126; 3089 – 3095

- IGNAR-TROWBRIDGE, D.M.; NELSON, K.G.; BIDWELL, M.C.; CURTIS, S.W.; WASHBURN, T.F.; MacLACHLAN, J.A.; KORACH, K.S. (1992)
Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor
Proceedings of the National Academy of Science of the USA 89; 4658 - 4662
- IMAI, T.; KURACHI, H.; ADACHI, K.; ADACHI, H.; YOSHIMOTO, Y. (1995)
Changes in epidermal growth factor receptor and the levels of its ligands during menstrual cycle in human endometrium
Biology of Reproduction 52; 928 - 938
- IMAMURA, T.; OKA, S.; TANAHASHI, T.; OKITA, Y. (1994)
Cell cycle-dependent nuclear localization of exogenously added fibroblast growth factor-1 in BALB/c 3T3 and human vascular endothelial cells
Experimental Cell Research 215; 363 – 372
- IMAMURA, T.; TOKITA, Y.; MITSUIU, Y. (1992)
Identification of a heparin-binding growth factor-1 nuclear translocation sequence by deletion mutation analysis
Journal of Biological Chemistry 267; 5676 - 5679
- JACKSON, P.; BLYTHE, D. (1995)
Immunolabelling techniques for light microscopy
In: Immunocytochemistry, A practical approach; Ed.: J.E. Beesley; IRL Press at Oxford University Press; 15 - 41
- JOHNSON, D.C.; CHATTERJEE, S. (1993)
Epidermal growth factor (EGF) replaces estradiol for the initiation of embryo implantation in the hypophysectomized rat
Placenta 14; 429 – 438
- JOHNSON, D.E.; LU, J.; CHEN, H.; WERNER, S.; WILLIAMS, L.T. (1991)
The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain
Molecular and Cellular Biology 11; 4627 – 4634
- JOHNSON, D.E.; WILLIAMS, L.T. (1993)
Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family
Advances in Cancer Research 60; 1 – 41
- KAUFMANN, S.H.E. (1991)
Antikörper und Antigene
In: Medizinische Mikrobiologie, Ed.: Hahn, Falke, Klein; Springer-Lehrbuch; Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1991; 131 - 226

- KAWAGOE, K.; AKIYAMA, J.; KAWAMOTO, T.; MORISHITA, Y.; MORI, S. (1990)
Immunohistochemical demonstration of epidermal growth factor (EGF)
receptors in normal human placental villi
Placenta 11; 7-15
- KENNEDY, TH.G.; BROWN, K.D.; VAUGHAN, T.J. (1994)
Expression of the genes for the epidermal growth factor receptor and its
ligands in porcine oviduct and endometrium
Biology of Reproduction 50; 751 - 756
- KLEINSTEIN, J.; WESTERMANN, W.; MENNENGA, K.; GUSTMANN, CH.; GIPS, H.
(1993)
Estrogen induces expression of endometrial epidermal growth factor receptors
before implantation
American Journal of Reproductive Immunology 30; 58 - 62
- KLIEM, A.; TETENS, F.; NIEMANN, H.; FISCHER, B. (1998)
Only a truncated epidermal growth factor receptor protein is present in porcine
endometrium
Biology of Reproduction 58; 1367 – 1371
- KLISCH, K. (1998)
Die Entwicklung boviner Trophoblastriesenzellen: Histologische,
cytophotometrische und interphase-cytogenetische Untersuchungen zum
Mechanismus der Genom-Multiplikation
*Inaugural-Dissertation zum Erlangen des Doktorgrades beim Fachbereich
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen*
- KLISCH, K.; HECHT, W.; PFARRER, C.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B.; LEISER,
R. (1999a)
DNA content and ploidy level of bovine placentomal trophoblast giant cells
Placenta 20, 451 – 458
- KLISCH, K.; PFARRER, C.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B.; LEISER, R. (1999b)
Tripolar acytokinetic mitosis and formation of feto-maternal syncytia in the
bovine placentome: different modes of the generation of multinuclear cells
Anatomy and Embryology 200; 229 – 237
- KRIZ, W.; HAHNEL, B.; ROSENER, S.; ELGER, M. (1995)
Long-term treatment of rats with FGF-2 results in focal segmental
glomerulosclerosis
Kidney International 48; 1435 – 1450
- KUDLOW, J.E.; BJORGE, J.D. (1990)
TGF alpha in normal physiology
Seminars in Cancer Biology 1; 293 - 302
- KUMAR, V.; BUSTIN, S.A.; McKay, I.A. (1995)
Transforming growth factor alpha
Cell Biology International 19; 373 - 388

- LADINES-LLAVE, C.A.; MARUO, T.; MANALO, A.M.; MOCHIZUKI, M. (1993)
Decreased expression of epidermal growth factor and its receptor in the malignant transformation of trophoblasts
Cancer 71; 4118 – 4123
- LASLETT, A.L.; McFARLANE, J.R.; RISBRIDGER, G.P. (1997)
Developmental response by Leydig cells to acidic and basic fibroblast growth factor
Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 60; 171 - 179
- LEE, P.L.; JOHNSON, D.E.; COUSENS, L.S.; FRIED, V.A.; WILLIAMS, L.T. (1989)
Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor
Science 245; 57 – 60
- LEISER, R. (1975)
Kontaktaufnahme zwischen Trophoblast und Uterusepithel während der frühen Implantation beim Rind
Anatomica, Histologia, Embryologia 4; 63 - 86
- LEISER, R.; KAUFMANN, P. (1994)
Placental structure: in a comparative aspect
Experimental and Clinical Endocrinology 102; 122 - 134
- LEISER, R.; KREBS, C.; EBERT, B.; DANTZER, V. (1997a)
Placental vascular corrosion cast studies: a comparison between ruminants and humans
Microscopy Research and Technique 38; 76 – 87
- LEISER, R.; KREBS, C.; KLISCH, K.; EBERT, B.; DANTZER, V.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B. (1997b)
Fetal villosity and microvasculature of the bovine placentome in the second half of gestation
Journal of Anatomy 191; 517 - 527
- LIEBERMANN, J.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. (1996)
Effects of local growth factors on the secretory function of bovine corpus luteum during the oestrus cycle and pregnancy in vitro
Reproduction and Fertility in Development 8; 1003 – 1011
- LIN, Y.Z.; YAO, S.Y.; HAWIGER, J. (1996)
Role of the nuclear localization sequence in fibroblast growth factor-1-stimulated mitogenic pathways
Journal of Biological Chemistry 271; 5305 - 5308
- LIU, X-H.; WILEY, S.; MEILKE, A.W. (1993)
Androgens regulate Proliferation of human prostate cancer cells in culture by increasing transforming growth factor- α (TGF- α) and epidermal growth factor (EGF)/(TGF- α receptor)
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 77; 1472 – 1478

- LOBB, D.K.; KOBRIN, M.S.; KUDLOW, J.E.; DORRINGTON, J.H. (1989)
Transforming Growth Factor-Alpha in the Adult Bovine Ovary: Identification in Growing Ovarian Follicles
Biology of Reproduction 40; 1087 – 1093
- LOBB, R.R.; FETT, J.W. (1984)
Purification of two distinct growth factors from bovine neural tissue by heparin affinity chromatography
Biochemistry 23; 6295 - 6299
- LOGAN, A.; HILL, D.J. (1992)
Bioavailability: Is this a key event in regulating the actions of peptide growth factors?
Journal of Endocrinology 134; 157 - 161
- LUCIANO, A.M.; PAPPALARDO, A.; RAY, C.; PELUSO, J.J. (1994)
Epidermal growth factor inhibits large granulosa cell apoptosis by stimulating progesterone synthesis and regulating the distribution of intracellular free calcium
Biology of Reproduction 51; 646-654
- LYSIAK, J.J.; HAN, V.K.M.; LALA, P.K. (1993)
Localization of transforming growth factor- α in the human placenta and decidua: role in trophoblast growth
Biology of Reproduction 49; 885 - 894
- MADIAI, F.; HACKSHAW, K.V.; CHIU, I.M. (1996)
Cloning and characterization of the mouse FGF-1 gene
Gene 179; 231 - 236
- MADTES, D.K.; RAINES, E.W.; SAKARIASSEN, K.S.; ASSOIAN, R.K.; SPORN, M.B.; BELL, G.L.; ROSS, R. (1988)
Induction of transforming growth factor- α in activated human alveolar macrophages
Cell 53; 285 - 293
- MARQUARDT, H.; HUNKERPILLER, M.W.; HOOD, L.E.; TODARO, G.J. (1984)
Rat transforming growth factor type I: structure and relation to epidermal growth factor
Science 223; 1079 - 1082
- MARQUARDT, H.; HUNKERPILLER, M.W.; HOOD, L.E.; TWARDZIK, D.R.; et al. (1983)
Transforming growth factors produced by retrovirus-transformed rodent fibroblasts and human melanoma cells: amino acid sequence homology with epidermal growth factor
Proceedings of the National Academy of Science of the USA 80; 4684 – 4688

- MARUO, T.; MOCHIZUKI, M. (1987)
Immunohistochemical localization of epidermal growth factor receptor and myc oncogene product in human placenta: Implication for trophoblast proliferation and differentiation
American Journal of Obstetrics and Gynecology 156; 721 – 727
- MASSAGUÉ, J. (1990)
Transforming growth factor- α
Journal of Biological Chemistry 265; 21393 - 21396
- MATAMOROS, A.; CAAMANO, L.; LAMB, S.V.; REIMERS, T.J. (1994)
Estrogen production by bovine binucleate and mononucleate trophoblastic cells in vitro
Biology of Reproduction 51; 486 - 492
- MELLIN, T.N.; MENNIE, R.J.; CASHEN, D.E.; RONAN, J.J.; CAPPARELLA, J.; JAMES, M.L.; DISALVO, J.; FRANK, J.; LINEMEYER, D.; GIMENEZ-GALLEGO, G.; et al. (1992)
Acidic fibroblast growth factor accelerates dermal wound healing
Growth Factors 7; 1 - 14
- MEYER, H.H.D. (1994)
Hormonrezeptoren: Überträger der Hormonwirkung in den Zielzellen
In: Veterinärmedizinische Endokrinologie, Döcke F (Hrsg.), Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart; 76-91
- MORGAN, G.; WOODING, F.B.P.; GODKIN, J.D. (1993)
Localization of bovine trophoblast protein-1 in the cow blastocyst during implantation: an immunological cryo-ultrastructural study
Placenta 14; 641 - 649
- MOSSMANN, H.W. (1987)
Vertebrate fetal membranes
In: Comparative ontogeny and morphology; evolution; phylogenetic significance; basic functions; research opportunities; Basingstoke, UK Macmillan, London
- MOULTON, B. C. (1994)
Transforming growth factor- β stimulates endometrial stromal apoptosis in vitro
Endocrinology 134; 1055 - 1060
- MUELLER, S.G.; KUDLOW, J.E. (1991)
Transforming growth factor-beta (TGF- β) inhibits TGF alpha expression in bovine anterior pituitary-derived cells
Molecular endocrinology (Bethesda) 5; 1439 - 1446

- MÜHLHAUSER, J.; CRESCIMANNO, C.; KAUFMANN, P.; HOFER, H.; ZACCHEO, D.; CASTELLUCCI, M. (1993)
Differentiation and proliferation patterns in human trophoblast revealed by c-erbB-2 oncogene product and EGF-R
Journal of Histochemistry and Cytochemistry 41; 165 – 173
- MÜHLHAUSER, J.; MARZIONI, D.; MORRONI, M.; VUCKOVIC, M.; CRESCIMANNO, C.; CASTELLUCCI, M. (1996)
Codistribution of basic fibroblast growth factor and heparan sulfate proteoglycan in the growth zones of the human placenta
Cell and Tissue Research 285; 101 - 107
- MUKKU, V.R.; STANCEL, G.M. (1985)
Regulation of epidermal growth factor receptor by estrogen
Journal of Biological Chemistry 260; 9820 - 9824
- MUNSON, L.; WILHITE, A.; BOLTZ, V.F.; WILKINSON, J.E. (1996)
Transforming growth factor β in bovine placentas
Biology of Reproduction 55; 748 - 755
- NEUFELD, G.; GOSPODAROWICZ, D. (1985)
Basic and acidic fibroblast growth factors interact with the same cell surface receptors
Journal of Biological Chemistry 261; 5631 – 5637
- ORNITZ, D.M.; YAYON, A.; FLANAGAN, J.G.; SVAHN, C.M.; LEVI, E.; LEDER, P. (1992)
Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells
Molecular and Cellular Biology 12; 240 – 247
- ORNITZ, D.M.; XU, J.; COLVIN, J.S.; McEWEN, D.G.; MacARTHUR, C.A.; COULIER, F.; GAO, G.; GOLDFARB, M. (1996)
Receptor specificity of the fibroblast growth factor family
The Journal of Biological Chemistry 271; 15292 – 15297
- PANDIELLA, A.; MASSAGUÉ, J. (1991)
Cleavage of the membrane precursor for transforming growth factor alpha is a regulated process
Proceedings of the National Academy of Science of the USA 88; 1726 - 1730
- PASUMARTHI, K.B.; KARDAMI, E.; CATTINI, P.A. (1996)
High and low molecular weight fibroblast growth factor-2 increase proliferation of neonatal rat cardiac myocytes but have differential effects on binucleation and nuclear morphology. Evidence for both paracrine and intracrine actions of fibroblast growth factor-2
Circulation Research 78; 126 - 136

- PATRY, V.; ARNAUD, E.; AMALRIC, F.; PRATS, H. (1994)
Involvement of basic fibroblast growth factor NH2 terminus in nuclear accumulation
Growth Factors 11; 163 - 174
- PIVA, M.; FLIEGER, O.; RIDER, V. (1996)
Growth factor control of cultured rat uterine stromal cell proliferation is progesterone dependent
Biology of Reproduction 55; 1333 - 1342
- PÖHLAND, R.; TIEMANN, U. (1994)
Immunohistochemical localization of the epidermal growth factor and its binding sites in the bovine female reproductive tract.
Journal of Reproduction and Fertility, Abstract Series 14; 21
- PRESTA, M. (1988)
Sex hormones modulate the synthesis of basic fibroblast growth factor in human endometrial adenocarcinoma cells: implications for the neovascularization of normal and neoplastic endometrium
Journal of Cellular Physiology 137; 593 – 597
- PRESTA, M.; GUALANDRIS, A.; URBINATI, C.; RUSNATI, M.; COLTRINI, D.; ISACCHI, A.; CACCIA, P.; BERGONZONI, L. (1993)
Subcellular localization and biological activity of Mr 18.000 basic fibroblast growth factor: site-directed mutagenesis of a putative nuclear translocation sequence
Growth factors 9; 269 – 278
- RAAB, G.; KLAGSBRUN, M. (1997)
Heparin-binding EGF-like growth factor
Biochimica et Biophysica Acta 1333; F179 - F199
- RAO, C.V.; LI, X.; TOTH, P.; LEI, Z.M. (1995)
Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and their common receptor genes in human umbilical cords
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 80; 1012 - 1020
- RENAUD, F.; OLIVER, L.; DESSET, S.; TASSIN, J.; ROMQUIN, N.; COURTOIS, Y.; LAURENT, M. (1994)
Up-regulation of aFGF expression in quiescent cells is related to cell survival
Journal of Cellular Physiology 158; 435 - 443
- REYNOLDS, L.P.; MILLAWAY, D.S.; KIRSCH, J.D.; INFELD, J.E.; REDMER, D.A. (1987)
Angiogenic activity of placental tissues of cows
Journal of Reproduction and Fertility 81; 233 - 240

- RIFKIN, D.B.; MOSCATELLI, D.; ROGHANI, M.; NAGANO, Y.; QUARTO, N.; KLEIN, S.; BIKFALVI, A. (1994)
Studies on FGF-2: nuclear localization and function of high molecular weight forms and receptor binding in the absence of heparin
Molecular Reproduction and Development 39; 102 – 104
- ROBERTS, A.B.; AZANO, M.A.; LAMB, L.J.; SMITH, J.M.; SPORN, M.B. (1981)
New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues
Proceedings of the National Academy of Science of the USA 78; 5339 - 5343
- SCARAMUZZI, R.J.; DOWNING, J.A. (1995)
The in vivo effects of fibroblast growth factor and epidermal growth factor on the secretion of oestradiol, androstenedione and progesterone by the autotransplanted ovary in the ewe
Journal of Endocrinology 146; 301 – 311
- SCHAMS, D.; AMSELGRUBER, W.; EINSPANIER, R.; SINOWATZ, F.; GOSPODAROWICZ, D. (1994)
Localization and tissue concentration of basic fibroblast growth factor in the bovine corpus luteum
Endocrine 2; 907 – 912
- SCHLESSINGER, J.; ULLRICH, A. (1992)
Growth factor signalling by receptor tyrosine kinases
Neuron 9; 383 – 391
- SCHNORR, B. (1989)
Embryologie der Haustiere: Ein Kurzlehrbuch
Ferdinand Enke Verlag, 2. Auflage Stuttgart, 3 - 212
- SCHULER, G.; WIRTH, C.; KLISCH, K.; FAILING, K.; HOFFMANN, B. (2000)
Characterization of proliferative activity in bovine placentomes between day 150 and parturition by quantitative immunohistochemical detection of Ki 67 antigene
Reproduction in Domestic Animals 35; 157 – 162
- SCHULER, G.; WIRTH, C.; KLISCH, K.; PFARRER, C.; LEISER, R.; HOFFMANN, B. (1999)
Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition
Biology of Reproduction 61; 797 – 801
- SCHULTZ, G.S.; WHITE, M.; MITCHELL, R.; BROWN, G.; LYNCH, J.; TWARDZIK, D.R.; TODARO, G.J. (1987)
Epithelial woundhealing enhanced by transforming growth factor alpha and vaccinia growth factor
Science 235; 350 - 352

- SHAMS, M.; AHMED, A. (1994)
Localization of mRNA for basic fibroblast growth factor in human placenta
Growth Factors 11; 105 – 111
- SHEMESH, M.; HAREL-MARKOWITZ, E.; GUREVICH, M.; SHORE, L.S. (1994)
Staurosporine stimulates progesterone production by bovine placental cells
Biology of Reproduction 51; 146-151
- SINGH, B.; KENNEDY, T.G.; TEKPETEY, F.R.; ARMSTRONG, D.T. (1995)
Gene expression and peptide localization for epidermal growth factor receptor and its ligands in porcine luteal cells
Molecular and Cellular Endocrinology 113; 137 – 143
- SLOWEY, M.J.; VERHAGE, H.G.; FAZLEABAS, A.T. (1994)
Epidermal growth factor, transforming growth factor- α , and epidermal growth factor receptor localization in the baboon (*Papio anubis*) uterus during the menstrual cycle and early pregnancy
Journal of the Society for Gynecologic Investigation 1; 277 – 284
- SPIVAK-KROIZMAN, T.; LEMMON, MA.; DIKIC, I.; LADBURY, JE.; PINCHASI, D.; HUANG, J.; JAYE, M.; CRUMLEY, G.; SCHLESSINGER, J.; LAX, I. (1994)
Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation
Cell 79; 1015 – 1024
- STIRLING, D.; WATERMAN, M.R.; SIMPSON, E.R. (1991)
Expression of mRNA encoding basic fibroblast growth factor (bFGF) in bovine corpora lutea and cultured luteal cells
Journal of Reproduction and Fertility 91; 1 – 8
- STRAHL, H. (1906)
Die Embryonalhüllen der Säugetiere und die Placenta
In: Hertwigs Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungsgeschichte der Wirbeltiere, Band 1, Fischer, Jena
- SUDHALTER, J.; FOLKMAN, J.; SVAHN, C.M.; BERGENDAL, K.; D'AMORE, P.A. (1989)
Importance of size, sulfation, and anticoagulant activity in the potentiation of acidic fibroblast growth factor by heparin
Journal Biological Chemistry 264; 6892 – 6897
- TAGA, M.; SAKAKIBARA, H.; SAJI, M.; MINAGUCHI, H. (1995)
Regulation of human decidual function by epidermal growth factor
Hormone Research 44 (Suppl. 2); 23 – 29

- TAHARA, M.; TASAKA, K.; MASUMOTO, N.; ADACHI, K.; IKEBUCHI, Y.; KURACHI, H.; MIYAKE, A. (1995)
Expression of messenger ribonucleic acids for epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor-alpha (TGF alpha), and EGF receptor in human amnion cells: possible role of TGF alpha in prostaglandin E2 synthesis and cell proliferation
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 80; 138 – 146
- TALAMANTES, F.; OGREN, L. (1988)
The placenta as an endocrine organ: polypeptides
In: The Physiology of Reproduction; Knobil E, Neill JD (Hrsg.), Raven Press, New York; 2093-2144
- TEIXIDÓ, J.; WONG, S.T.; LEE, D.C.; MASSAGUÉ, J. (1990)
Generation of transforming growth factor alpha from the cell surface by an O-glycosylation-independent multistep process
Journal of Biological Chemistry 265; 6410 - 6415
- TODARO, G.J.; DeLARCO, J.E.; COHEN, S. (1976)
Transformation by murine and feline sarcoma viruses specifically blocks binding of epidermal growth factor to cells
Nature 264; 26 - 31
- TROWELL, O.A.; CHIR, B.; WILLMER, E.N. (1939)
Growth of tissues in vitro. VI. The effects of some tissue extracts on the growth of periosteal fibroblasts
Journal of Experimental Biology 16; 60 - 70
- UMEKITA, Y.; ENOKIZONO, N.; SAGARA, Y.; KURIWAKI, K.; TAKASAKI, T.; YOSHIDA, A.; YOSHIDA, H. (1992)
Immunohistochemical studies on oncogene products (EGF-R, c-erbB-2) and growth factors (EGF, TGF-alpha) in human breast cancer: their relationship to oestrogen receptor status, histological grade, mitotic index and nodal status
Virchows Archives A, Pathological Anatomy and Histopathology 420; 345 – 351
- VAN WEZEL, I.L.; UMAPATHYSIVAM, K.; TILLEY, W.D.; RODGERS, R.J. (1995)
Immunolocalization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles
Molecular and Cellular Endocrinology 115; 133 – 140
- VAUGHAN, T.J.; JAMES, P.S.; PASCALL, J.C.; BROWN, K.D. (1992)
Expression of the genes for TGF alpha, EGF and the EGF receptor during early pig development
Development 116; 663 - 669
- VERNON, R.K.; SPICER, L.J. (1994)
Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells
Journal of Animal Science 72; 2696 – 2702

- VIUFF, D.; HYTTEL, P.; GREWVE, T.; ERIKSEN, T.; ALEXANDERSEN, S. (1995)
Transcription and localization of growth factor mRNA in the bovine oviduct
Molecular Reproduction and Development 42; 28 – 34
- WANDJI, S.-A.; PELLETIER, G.; SIRARD, M.-A. (1992)
Ontogeny and cellular localization of 125I-labeled basic fibroblast growth factor and 125I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves
Biology of Reproduction 47; 807 – 813
- WATSON, A.J.; HOGAN, A.; HAHNEL, A.; WIEMER, K.E.; SCHULTZ, G.A. (1992)
Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo
Molecular Reproduction and Development 31; 87 - 95
- WEIMANN, E.; KIESS, W. (1995)
Fibroblast Growth Factor;
In: *Wachstumsfaktoren: Grundlagen und klinische Anwendung; 2. Auflage*, Stuttgart, New York, F. K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH; 98 - 105
- WERNER, S.; DUAN, D.S.; DeVRIES, C.; PETERS, K.G.; JOHNSON, D.E.; WILLIAMS, L.T. (1992)
Differential splicing in the extracellular region of fibroblast growth factor receptor 1 generates receptor variants with different ligand-binding specificities
Molecular and Cellular Biology 12; 82 – 88
- WILLIAMS, W.F.; MARGOLIS, M.J.; MANSPEAKER, J.; DOUGLASS, L.W.; DAVIDSON, J.P. (1987)
Peripartum changes in the bovine placenta related to fetal membrane retention
Theriogenology 28; 213 - 223
- WIMSATT, W. A. (1951)
Observation on the morphogenesis, cytochemistry and significance of the binucleate giant cells of the placenta of ruminants
American Journal of Anatomy 89; 233 - 281
- WOICKE, J.; SCHOON, H.-A.; HEUWIESER, W.; SCHULZ, L.-CL.; GRUNERT, E. (1986)
Morphologische und funktionelle Aspekte plazentarer Reifungsmechanismen beim Rind
Journal of Veterinary Medicine A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine 33; 660 – 667
- WONG, D.T.; WELLER, P.F.; GALLI, S.J.; ELOVIC, A.; RAND, T.H.; GALLAGHER, G.T.; CHIANG, T.; CHOU, M.Y.; MATOSSIAN, K.; McBRIDE, J.; TODD, R. (1990)
Human eosinophiles express transforming growth factor alpha
Journal of Experimental Medicine 172; 673 - 681

- WOODING, F.B.P. (1992)
Current topic: The synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production
Placenta 13; 101 – 113
- WOODING, F.B.P.; FLINT, A.P.F. (1994)
Placentation
Marshall's Physiology of Reproduction, Vol. 3, Pregnancy and Lactation, Ch. 4, G.E. Lamming, ed. Chapman and Hall, London; 233 - 460
- WOODING, F.B.P.; WATHES, C.D. (1980)
Binucleate cell migration in the bovine placentome
Journal of Reproduction and Fertility 59; 425 - 430
- WORDINGER, R.J.; SMITH, K.J.; BELL, CHR.; CHANG, I-F.C. (1994)
The immunolocalization of basic fibroblast growth factor in the mouse uterus during the initial stages of embryo implantation
Growth Factors 11; 175 - 186
- YAMAMOTO, S.; KONISHI, I.; NANBU, K.; KOMATSU, T.; MANDAI, M.; KURODA, H.; MATSUSHITA, K.; MORI, T. (1997)
Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) during folliculogenesis in the human ovary
Gynecological Endocrinology 11; 223 – 230
- YAYON, A.; KLAGSBRUN, M.; ESKO, J.D.; LEDER, PH.; ORNITZ, D.M. (1991)
Cell surface heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor
Cell 64; 841 – 848
- YU, Z.X.; BIRO, S.; FU, Y.M.; SANCHEZ, J.; SMALE, G.; SASSE, J.; FERRANS, V.J.; CASSCELLS, W. (1993)
Localization of basic fibroblast growth factor in bovine endothelial cells: immunohistochemical and biochemical studies
Experimental Cell Research 204; 247 - 259
- YUI, J.; HEMMINGS, D.; GARCIA-LLORET, M.; GUILBERT, L.J. (1996)
Expression of the human p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in primary villous trophoblasts and their role in cytotoxic signal transduction
Biology of Reproduction 55; 400 - 409
- ZHAN, X.; HU, X.; FRIEDMAN, S.; MACIAG, T. (1992)
Analysis of endogenous and exogenous nuclear translocation of fibroblast growth factor-1 in NIH 3T3 cells
Biochemical and Biophysical Research Communications 188; 982 - 991

ZHENG, J.; VAGNONI, K.E.; BIRD, I.M.; MAGNESS, R.R. (1997)

Expression of basic fibroblast growth factor, endothelial mitogenic activity and angiotensin II type-1 receptors in the ovine placenta during the third trimester of pregnancy

Biology of Reproduction 56; 1189 – 1197

ZURFLUH, L.L.; BOLTEN, S.L.; BYATT, J.C.; McGRATH, M.F.; TOU, J.S.; ZUPEC, M.E.; KRIVI, G.G. (1990)

Isolation of genomic sequence encoding a biologically active bovine TGF-alpha protein

Growth Factors 3; 257 – 266

9 Anhang

9.1 *Geräte, Reagenzien, Puffer und Lösungen*

9.1.1 Geräte

Deckgläser:	Menzel-Gläser, 24x40 mm, 24x50 mm und 24x60 mm, MAGV Laborbedarf, Rabenau-Londorf
Einbettungsautomat:	Microm Laborgeräte GmbH, Heidelberg
Einmalmesser für Mikrotom:	Einmalklingen Modell 819, ST 14036826457, Leica Vertrieb GmbH, Bensheim
Eppendorfpipetten:	Variable Mikroliterpipetten und Fixvolumenpipetten von Eppendorf
Faltenfilter:	Ø15cm, Art.: 311 645; Schleicher & Schuell, Dassel
Kamera:	JVC Colour Video Camera, TK-1070 E, RGB, JVC Professional Products GmbH, Grüner Weg 10, 61165 Friedberg
Magnetrührer:	Heidolph, Typ: MR 2002, Volt: 220/240, Hz: 50, Watt: 630, 0 - 1250 U/min, Serial-No.: 42628, Geräte-Nr.: 50304
Messerhalter:	Halterset: 24 cm lang, 2 Andrückplatten, Leica Vertrieb GmbH, Bensheim
Mikrotom:	Fabrik-Nr.:23076; Reichardt Jung AG, Heidelberg
Mikrowelle:	Moulinex Compact, Typ: Y 50, Mod.: 1 M 800 PP00, Volt: 230, Watt: 800, Hz.: 50, Freq.: 2450 MHz , F 25027231
Objektträger:	Superior Marienfeld, gereinigt, Kanten geschnitten, beidseitiger Mattrand, Größe: 76x26x1 mm, approx.: 3" x 1", No.: 700232, MAGV Laborbedarf, Rabenau-Londorf

Paraffinausgießstation:	Histoembedder EG 1160, Leica Instruments GmbH, Nußloch
Pumpe:	KNF Neuberger, Typ: No 035. 1. 2 AN. 18, Nr.: 472678; VDE 0530, Nr.: 83424, Motortyp: MW63/4, IP 44, Volt: 220, 1,8 A, 0,12 kW, 50 Hz, 1400 U/min, Freiburg
Rüttler:	KL 2, Edmund Bühler, Tübingen
Vortex:	Heidolph, Typ: REAX 2000, Volt: ~220, Hz: 50, W: 42, 200 - 2400 U/min, No.: 54119, Serial-No.: 15215
Sterilfilter:	FP 030/3 Einmal-Filterhalter, 0,2 µm, 7 bar max., steril, pyrogenfrei, Schleicher & Schuell, Dassel
Wärmeschrank:	Memmert, Typ: 3 26, F-Nr.: 340 073, 220 Volt, 380 Watt, 50/60 Hz, Din 12880-Kl. 0, Nenntemp.: 70°C, Schutzart Din 40050-IP20, Schwabach
Wasserbad:	Typ WB - 24; V 220; W 550; Fabrik-Nr.: 8810, max. 90°C; MEDAX Nagel KG Kiel;

9.1.2 Reagenzien

9.1.2.1 Chemikalien

ABC-Lösung:	Peroxidase Standart; Vectastain® PK 4000, Mouse
APES:	3-Aminopropyltriethoxy-silan, C ₉ H ₂₃ NO ₃ Si, purum, ~96%, Mr=221,37 (919-30-2); Analysis-No.: 365309/111097; EEC-No.:2130484; Art.: 09324; Fluka Chemica

Aqua demineralisata:	Seral-Anlage mit angeschlossener Millipore-Reinigungsanlage: Milli Q, Water Purification System Firma Millipore, Typ MQ 4-fach UF Vertrags-Nr.: MAD-070-89 Das demineralisierte Wasser aus dieser Anlage hat laut Aussagen der Hersteller A. dest.-Qualität. Es wird daher in dieser Arbeit ausschließlich von A. dest. gesprochen.
BSA:	Serumalbumin, bovine; Fraktion V; Art.: A-9418; Lot.-No.: 107H1180, EEC-No.: 232-936-2, Sigma
$C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$:	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, p. a., M=294,10 g/mol, Art.: 6448, 302 K10020548; Merck
$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$:	Zitronensäure-Monohydrat krist. reinst, M=210,14 g/mol, Art.: 1.00242, 411 K20319444; Merck
DAB:	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid-Dihydrat, $C_{12}H_{14}N_4 \cdot 4 HCl \cdot 2 H_2O$, purum p.a., Mr 396,15; Analysis-No.: 366124/1 30597, Art.:32750, EEC No.: 2310189; Fluka
Ethanol:	C_2H_5OH , 99,6%, DAB 10, M=46,07 g/mol, D 0,79, Art.: 5054.2; Carl Roth GmbH + Co.,76185 Karlsruhe
Eukitt:	Eukitt [®] , Schnelleinschlußmittel für Mikroskopie, Chargen-Nr.:10420, Artikel-Nr.: 33949, Riedel-de-Haën AG, Seelze
Formaldehyd:	$HCHO$, mind. 37%, M=30,03 g/mol, 1L=1,09 kg, säurefrei für Histologie, stabilisiert mit 10% Methanol und Dolomitstaub, Art.: 3999; Merck

Hämatoxilin-Farblösung:	Papanicolaou1)b)-Farblösung, Hämatoxilin-Lösung S; Diagnostica Merck
HCl:	Salzsäure, rauchend, 37%ig, M=36,46 g/mol, 1 Liter=1,19 kg Art.: 906 K11409117; Merck
Imidazol:	C ₃ H ₄ N ₂ , Mr 68,08, [288-324] puriss. p.a.: ≥ 99.98, Bestell-Nr.: 56750; Fluka Chemica
KH ₂ PO ₄ :	Kaliumdihydrogenphosphat, krist. reinst, M=136,09 g/mol, Art.: 4871; Merck
Na ₂ HPO ₄ :	di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei für Analyse, M=141,96 g/mol, Art.: 1.06559.0500; Merck
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O:	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, M=177,99 g/mol, Art.: 6580, 309 K 19368380; Merck
NaCl:	Natriumchlorid reinst, M: 58,44 g/mol, Art.:1.06400; Merck
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O:	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, M=137,99 g/mol, Art.: 6346; Merck
NaOH:	Natriumhydroxid, 2 mol/l = 2N, 1 Liter = 0,079 kg, Art.: 60164531; Merck
Tween 20:	Polyoxyethylenesorbitan Monolaurat, P-1379; Sigma
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂):	30%ig, Art.-Nr.: 822287; Merck-Schuchardt
Xylol:	Xylol-Isomerengemisch C ₈ H ₁₀ , M: 106,17 g/mol, 1 Liter = 0,86 kg, VbF A 11; Merck-Schuchardt,

9.1.2.2 Antikörper und Sera

Biomol Feinchemikalien GmbH, 22769 Hamburg ⇒ Vertrieb von UBI-Produkten in Deutschland:

- ◆ Polyklonaler Kaninchen anti Rinder aFGF-Faktor IgG
- ◆ Monoklonaler Maus anti Rinder bFGF-Faktor IgG1 κ

Calbiochem-Novabiochem GmbH, 65812 Bad Soden:

- ◆ Polyklonaler Schaf anti human TGF- α -Faktor, C-Terminus human

Chemicon International, 65719 Hofheim/Ts:

- ◆ Monoklonaler Maus anti Rinder FGF-Rezeptor IgM

Linaris, Biologische Produkte GmbH, 97877 Bettingen ⇒ Vertrieb von Vector-Produkten:

- ◆ Avidin-Biotin-Komplex Peroxidase Standart; Vectastain[®] PK 4000, Mouse IgG
- ◆ Biotinyliertes Ziege anti Kaninchen IgG (H+L-Kette), Vector BA-1000
- ◆ Biotinyliertes Pferd anti Maus IgG (H+L-Kette), Vector BA-2000
- ◆ Biotinyliertes Ziege anti Maus IgM (H+L-Kette), Vector BA-2020
- ◆ Biotinyliertes Kaninchen anti Schaf IgG (H+L-Kette), Vector BA-6000
- ◆ Unkonjugierter Kaninchen anti Schaf IgG (H+L-Kette), Vector AI-6000

PharMingen, Becton Dickinson GmbH, 22335 Hamburg:

- ◆ Monoklonaler Maus IgM κ , anti Trinitrophenol-KLH (keyhole limpet hemocyanin)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82039 Deisenhofen:

- ◆ Monoklonaler Maus anti human EGF-Rezeptor IgG1

Prof. Dr. D. Schams, Weißenstephan:

- ◆ Polyklonaler Kaninchen anti Rinder bFGF-Faktor

PD Dr. L. Wieler, damals Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Giessen:

- ◆ Monoklonaler Maus anti Clostridium perfringens-Toxin IgG1 κ

9.1.3 Puffer und Lösungen

ABC-LÖSUNG:

Kommerziell erhältliches Peroxidase Vectastain® ABC-Kit PK-4000:

Lösung A: 9 µl

Lösung B: 9 µl

PBS ⇒ ad 1000 µl

Die Lösung muß laut Angaben des Herstellers im Datenblatt zur Ausbildung der ABC-Komplexe 30 Min. vor Gebrauch angesetzt werden.

3-AMINOPROPYLTRIETHOXY-SILAN 2% (APES):

APES 10,0 ml

Aceton, reinst 490,0 ml

DAB-GEBRAUCHSLÖSUNG:

DAB 100 mg

Imidazol-HCl 200 ml

30%iges H₂O₂ 70 µl

Das DAB-Pulver wird mit Imidazol-HCl aufgelöst und durch einen Faltenfilter (siehe Kapitel: 9.1.1, Seite 162) filtriert. Anschließend wird das H₂O₂ zugegeben, die Küvette auf den Magnetrührer gestellt und die gesamte Lösung gut durchmischt. Nach Zugabe des H₂O₂ ist die Gebrauchslösung nur noch für 30 Min. haltbar.

FORMALIN 4%IG, PHOSPHATGEPUFFERT:

Formol (~ 40%) 500,0 ml

NaH₂PO₄*H₂O 20,0 g

Na₂HPO₄ 32,5 g

A. dest. ⇒ ad 5000,0 ml

Die Lösung hat den pH-Wert 7,0.

H₂O₂-LÖSUNG, 0,3%ig:

H ₂ O ₂ , 30%ig	2,0 ml
A. dest.	200,0 ml

IMIDAZOL-HCL:

Imidazol 0,1 M	8,51 g
A. dest.	1925,00 ml
HCl 1,0 n	~ 60,00 ml

Imidazol abwiegen und in A. dest. lösen, dann soviel von der 1 n HCl zufügen bis der pH-Wert 7,08 beträgt.

NATRIUMPHOSPHAT-PUFFER (0,1 M; PH 7,2):*Lösung 1 (0,1 m):*

NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	13,8 g
A. dest.	⇒ ad 1000,0 ml

Lösung 2 (0,1 m):

Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	17,8 g
A. dest.	⇒ ad 1000,0 ml

Gebrauchslösung:

Lösung 1:	28,3 ml
Lösung 2:	71,7 ml

PBS-PUFFER (PHOSPHATE BUFFERED SALINE):*Konzentrat:*

NaCl	41,00g
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	11,00g
KH ₂ PO ₄	2,75g
A. dest.	⇒ ad 1000,00 ml

Gebrauchslösung:

Konzentrat 1 Teil
A. dest. 4 Teile

Die Gebrauchslösung hat den pH-Wert 7,2.

PBS-PUFFER MIT 2% BSA:

PBS-Puffer (s.o.) 1000,00 ml
Bov. Serumalbumin: 200,00 mg

ZITRATPUFFER (10 mM):

Stammlösung A: 0,1 M Zitronensäure:

$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 21,01 g
A. dest. \Rightarrow ad 1000,00 ml

Stammlösung B: 0,1 M Natriumcitrat:

$C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ 29,41 g
A. dest. \Rightarrow ad 1000,00 ml

Gebrauchslösung:

Stammlösung A: 9 ml
Stammlösung B: 41 ml
A. dest. 450 ml

Man erhält 500 ml der 10mM Zitratpuffer-Gebrauchslösung mit dem pH-Wert 6,0.

9.2 *Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der immunhistologischen Nachweisreaktionen*

9.2.1 Immunhistologischer Nachweis der Wachstumsfaktoren

9.2.1.1 Nachweis von aFGF

Tabelle 11: Darstellung der Ergebnisse des immunhistologischen Nachweises von aFGF incl. der Ergebnisse der Negativkontrollen mit Kaninchenserum; Zusammenfassung der Ergebnisse der Tiere

Grav.-stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 150	Rd 21	4-12	deutliches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Zellen, überlappend mit deutlichem bis intensivem zytosolisches Signal in nahezu allen Zellen	deutliches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	deutliches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Zellen, überlappend mit schwachem bis intensivem zytosolisches Signal in nahezu allen Zellen
	Rd 22	100-108	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einzelnen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einigen Zellen, gleichzeitig schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in allen Zellen	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in vielen Zellen, gleichzeitig schwaches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen
	Rd 23	112-120	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	schwaches bis intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig deutliches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen	deutliches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Zellen, gleichzeitig schwaches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel­epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 220	Rd 14	16-24	schwaches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	deutliches bis intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig schwaches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen	schwaches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	deutliches bis (überwiegend) intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig schwaches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen
	Rd 15	124-132	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einzelnen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einigen Zellen, überlappend mit schwachem bis deutlichem zytosolischem Signal in nahezu allen Zellen	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	schwaches bis intensives nukleäres Signal in allen Zellen, überlappend mit schwachem bis deutlichem zytosolischem Signal in nahezu allen Zellen
	Kuh 3	136-144	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Zellen, gleichzeitig schwaches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Zellen, gleichzeitig schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in allen Zellen
Tag 240	Rd 16	28-36	deutliches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	deutliches bis intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig deutliches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen	deutliches bis intensives nukleäres Signal in allen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig deutliches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen
	Rd 19	148-156	deutliches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	deutliches bis intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig deutliches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen	deutliches bis intensives nukleäres Signal in allen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	deutliches bis (überwiegend) intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig schwaches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 240	Rd 20	160-168	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	deutliches bis intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig deutliches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen	schwaches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	deutliches bis intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig schwaches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen
Tag 270	Rd 17	40-48	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	schwaches bis intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig schwaches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	deutliches bis intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig schwaches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen
	Rd 18	52-60	schwaches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	deutliches bis intensives nukleäres in allen Zellen, gleichzeitig schwaches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen	schwaches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	deutliches bis intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig deutliches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen
	Rd 24	172-180	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	deutliches bis intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig deutliches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen	schwaches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig deutliches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen
Geburt	G 2	64-72	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	nicht mehr eindeutig abgrenzbar	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	deutliches bis intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig deutliches zytosolisches Signal in allen Zellen
	G 3	76-84	schwaches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	nicht mehr eindeutig abgrenzbar	deutliches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	deutliches bis intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig deutliches zytosolisches Signal in allen Zellen

Grav.-stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Geburt	G4	88-96	schwaches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht möglich	nicht mehr eindeutig abgrenzbar	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht möglich	deutliches bis intensives nukleäres Signal in allen Zellen, gleichzeitig schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in allen Zellen
Negativkontrollen mit inaktiviertem Kaninchenserum						
Tag 150	Rd 21	1-3	negativ			
	Rd 22	97-99	negativ			
	Rd 23	109-111	negativ			
Tag 220	Rd 14	13-15	negativ			
	Rd 15	121-123	negativ			
	Kuh 3	133-135	negativ			
Tag 240	Rd 16	25-27	negativ			
	Rd 19	145-147	deutliches parazelluläres Signal an der fetomaternalen Kontaktzone und schwaches zytosolisches Signal an den benachbarten Trophoblastzellen			
	Rd 20	157-159	deutliches parazelluläres Signal an der fetomaternalen Kontaktzone, teilweise auch zytosolisches Signal in Trophoblastzellen			
Tag 270	Rd 17	37-39	negativ			
	Rd 18	49-51	negativ			
	Rd 24	169-171	negativ			
Geburt	G 2	61-63	negativ			
	G 3	73-75	negativ			
	G 4	85-87	negativ			

9.2.1.2 Nachweis von bFGF

9.2.1.2.1 Verfahren 1: monoklonaler Maus anti Rind bFGF IgG1 κ

Tabelle 12: Darstellung der Ergebnisse des immunhistologischen Nachweises von bFGF; Verfahren 1 unter Verwendung des mAK, incl. der Ergebnisse der Negativkontrolle mit Nonsens-AK; Zusammenfassung der Ergebnisse der Tiere

Grav.-stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 150	Rd 21	1-9	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht möglich	granuliertes schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in allen Zellen	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einzelnen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht möglich	granuliertes schwaches bis intensives zytosolisches Signal in nahezu allen Uninukleären, intensives zytosolisches Signal in allen kleinen BNC, große BNC negativ

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel­epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 150	Rd 22	46-54	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	granuliertes schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in allen Zellen	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	granuliertes schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in nahezu allen Uninukleären, intensives zytosolisches Signal in allen kleinen BNC, große BNC negativ
	Rd 23	55-63	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	granuliertes sehr schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in allen Zellen	schwaches nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	granuliertes schwaches zytosolisches Signal in nahezu allen Uninukleären, deutliches bis intensives zytosolisches Signal in allen kleinen BNC, große BNC negativ
Tag 220	Rd 14	10-18	sehr schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	negativ	negativ	sehr schwaches zytosolisches Signal in einzelnen kleinen BNC
	Rd 15	64-72	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen, teilweise tritt auch perinukleäres/ zytosolisches Signal auf <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	negativ	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einzelnen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	in einigen Regionen granuliertes deutliches zytosolisches Signal in Uninukleären, schwaches bis intensives zytosolisches Signal in einigen kleinen BNC, große BNC negativ
	Kuh 3	73-81	deutliches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen, teilweise tritt auch perinukleäres/ zytosolisches Signal auf <small>genauere Zelldifferenzierung nicht möglich</small>	granuliertes sehr schwaches zytosolisches Signal in einigen Zellen	negativ	granuliertes schwaches bis intensives zytosolisches Signal in einigen Uninukleären, schwaches bis intensives zytosolisches Signal in einigen kleinen BNC, große BNC negativ

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkelepithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 240	Rd 16	19-27	sehr schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen intensives nukleäres Signal tritt bevorzugt an Septenspitze und in Mitte, genauere Zelldifferenzierung nicht möglich	granuliertes schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in allen Zellen, eingewanderte BNC negativ	intensives nukleäres Signal in einzelnen Endothelzellen	granuliertes schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in vielen Uninukleären, intensives zytosolisches Signal in vielen kleinen BNC, große BNC negativ
	Rd 19	82-93	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einzelnen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht möglich	negativ, Braunschleier tritt auch in Negativkontrolle auf	negativ	kaum auswertbar, alle Zellen in Negativkontrolle weisen deutliches zytosolisches Signal auf, daher als NEGATIV beurteilt
	Rd 20	97-104	deutliches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht möglich	negativ, Braunschleier tritt auch in Negativkontrolle auf	negativ	kaum auswertbar, alle Zellen in Negativkontrolle weisen deutliches zytosolisches Signal auf, daher als NEGATIV beurteilt
Tag 270	Rd 17	28-36	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht möglich	granuliertes schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in vielen Zellen	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einzelnen Stromazellen, teilweise tritt auch perinukleäres/ zytosolisches Signal auf genauere Zelldifferenzierung nicht möglich	granuliertes schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in einigen Uninukleären, deutliches bis intensives zytosolisches Signal in einigen kleinen BNC, große BNC negativ
	Rd 18	109-117	deutliches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht möglich	negativ, Braunschleier tritt auch in Negativkontrolle auf	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einzelnen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht möglich	kaum auswertbar, alle Zellen in Negativkontrolle weisen deutliches zytosolisches Signal auf, daher als NEGATIV beurteilt

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel­epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 270	Rd 24	118-126	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht möglich	nicht immer eindeutig abgrenzbar: granuliertes schwaches zytosolisches Signal in nahezu allen sichtbaren Zellen	deutliches nukleäres Signal in einzelnen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht möglich	granuliertes schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in einigen Uninukleären, deutliches bis intensives zytosolisches Signal in vielen kleinen BNC, große BNC negativ
Geburt	G 2	130-138	deutliches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht möglich	nicht mehr abgrenzbar	intensives nukleäres Signal in einer Kapillare	kaum auswertbar, alle Signale treten auch in Negativkontrolle auf, daher als NEGATIV beurteilt
	G 3	139-147	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht möglich	nicht mehr abgrenzbar	deutliches bis intensives nukleäres Signal in einzelnen Endothelzellen	kaum auswertbar, alle Signale treten auch in Negativkontrolle auf, daher als NEGATIV beurteilt
	G4	37-45	deutliches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht möglich	nicht mehr abgrenzbar	schwaches nukleäres Signal in einigen Endothelzellen	kaum auswertbar, alle Signale treten auch in Negativkontrolle auf, daher als NEGATIV beurteilt
Negativkontrollen mit monoklonalem Maus IgG1κ gegen Clostridium perfringens-Toxin						
Tag 150	Rd 21	148-156	negativ			
	Rd 22	151-153	negativ			
	Rd 23	154-156	negativ			
Tag 220	Rd 14	157-159	negativ			
	Rd 15	160-162	negativ			
	Kuh 3	163-165	negativ			
Tag 240	Rd 16	166-168	negativ			
	Rd 19	85-87	negativ	deutliches zytosolisches Signal in allen Zellen, Granula an fetomaternalen Kontaktzone (parazellulär)	negativ	deutliches zytosolisches Signal in allen Zellen, Granula an fetomaternalen Kontaktzone (parazellulär)

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkelepithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 240	Rd 20	94-96	negativ	deutliches zytosolisches Signal in allen Zellen, Granula an fetomaternal- er Kontaktzone (parazellulär)	negativ	deutliches zytosolisches Signal in allen Zellen, Granula an fetomaternalen Kontaktzone (parazellulär)
Tag 270	Rd 17	169-171	negativ			
	Rd 18	106-108	negativ	deutliches zytosolisches Signal in allen Zellen, Granula an fetomaternal- er Kontaktzone (parazellulär)		deutliches zytosolisches Signal in allen Zellen, Granula an fetomaternalen Kontaktzone (parazellulär)
	Rd 24	172-174	negativ			
Geburt	G 2	127-129	negativ			deutliches zytosolisches/ parazelluläres Signal in sehr vielen Zellen
	G 3	175-177	negativ			deutliches zytosolisches/ parazelluläres Signal in sehr vielen Zellen
	G4	178-180	negativ			deutliches zytosolisches/ parazelluläres Signal in sehr vielen Zellen

9.2.1.2.2 Verfahren 2: polyklonaler Kaninchen anti Rind bFGF

Tabelle 13: Darstellung der Ergebnisse des immunhistologischen Nachweises von bFGF; Verfahren 2 unter Verwendung des pAK, incl. der Ergebnisse der Negativkontrollen mit Kaninchenserum; Zusammenfassung der Ergebnisse der Tiere

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkelepithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 150	Rd 21	1-9	schwaches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches nukleäres Signal in einigen Zellen, teilweise überlappend schwaches zytosolisches Signal in einigen Zellen	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen BNC und einigen Uninukleären, teilweise überlappend schwaches zytosolisches Signal in einigen Trophoblastzellen (BNC und Uninukleäre gleichermaßen)

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkelepithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 150	Rd 22	73-81	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich</small>	schwaches nukleäres Signal in einzelnen Zellen	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich</small>	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen BNC, teilweise überlappend schwaches zytosolisches Signal in einigen Trophoblastzellen <small>(BNC und Uninukleäre gleichermaßen)</small>
	Rd 23	61-69	deutliches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich</small>	schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in vielen Zellen	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich</small>	deutliches bis intensives nukleäres Signal in einzelnen BNC, schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in vielen Trophoblastzellen <small>(BNC und Uninukleäre gleichermaßen)</small>
Tag 220	Rd 14	16-24	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich</small>	schwaches nukleäres Signal in einigen Zellen	negativ	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen BNC, teilweise überlappend schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in einigen Trophoblastzellen <small>(BNC und Uninukleäre gleichermaßen)</small>
	Rd 15	88-96	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich</small>	schwaches nukleäres Signal in einzelnen Zellen	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich</small>	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einigen BNC
	Kuh 3	100-108	deutliches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich</small>	negativ	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich</small>	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen BNC

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkelepithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 240	Rd 16	28-36	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich</small>	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einigen Zellen, teilweise überlappend schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in einigen Zellen	schwaches nukleäres Signal in einzelnen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich</small>	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen BNC, teilweise überlappend deutliches zytosolisches Signal in einigen Trophoblastzellen <small>(BNC und Uninukleäre gleichermaßen)</small>
	Rd 19	136-144	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich</small>	schwaches nukleäres Signal in einigen Zellen	sichtbare Anteile negativ	schwaches nukleäres Signal in einzelnen BNC
	Rd 20	160-168	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich</small>	schwaches bis deutliches nukleäres Signal in einigen Zellen, teilweise überlappend schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in einigen Zellen	sichtbare Anteile negativ	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einzelnen BNC, gleichzeitig schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in diesen BNC
Tag 270	Rd 17	37-45	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich</small>	schwaches nukleäres Signal in einzelnen Zellen, teilweise überlappend schwaches zytosolisches Signal in einzelnen Zellen	schwaches nukleäres Signal in einzelnen Zellen	schwaches nukleäres Signal in einzelnen BNC, teilweise überlappend schwaches zytosolisches Signal in einigen Trophoblastzellen <small>(BNC und Uninukleäre gleichermaßen)</small>
	Rd 18	148-156	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich</small>	schwaches nukleäres Signal in einzelnen Zellen	schwaches nukleäres Signal in einzelnen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich</small>	schwaches nukleäres Signal in einzelnen BNC

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkelepithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 270	Rd 24	172-180	schwaches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Zellen	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einzelnen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	deutliches bis intensives nukleäres Signal in einzelnen BNC, teilweise überlappend deutliches zytosolisches Signal in einigen Trophoblastzellen (BNC und Uninukleäre gleichermaßen)
Geburt	G 2	112-120	deutliches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	nicht mehr abgrenzbar	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives nukleäres Signal in erhaltenen BNC
	G 4	124-132	deutliches bis intensives nukleäres Signal in nahezu allen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	nicht mehr abgrenzbar	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	deutliches bis intensives nukleäres Signal in erhaltenen BNC
	G 5	49-57	deutliches bis intensives nukleäres Signal in vielen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	nicht mehr abgrenzbar	schwaches bis intensives nukleäres Signal in einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives nukleäres Signal in erhaltenen BNC, teilweise überlappend schwaches zytosolisches Signal in einigen Trophoblastzellen (BNC und Uninukleäre gleichermaßen)
Positiv-gewebe	C.I. Rind		deutliches nukleäres Signal in nahezu allen Endothelzellen, schwaches zytosolisches Signal in allen Lutealzellen			
Negativkontrollen mit inaktiviertem Kaninchenserum						
Positiv-gewebe	C.I. Rind		negativ			
Tag 150	Rd 21	10-12	schwacher zytosolischer Braunschleier in nahezu allen Zellen			
	Rd 22	82-84	geringgradig parazelluläre Ausflockungen, sonst negativ			
	Rd 23	70-72	leichte parazelluläre Braunschleier, sonst negativ			
Tag 220	Rd 14	13-15	negativ			
	Rd 15	85-87	negativ			
	Kuh 3	97-99	negativ			
Tag 240	Rd 16	25-27	negativ			
	Rd 19	133-135	negativ			
	Rd 20	157-159	negativ			

Grav.-stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkelepithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 270	Rd 17	46-48	negativ			
	Rd 18	145-147	negativ	schwaches zytosolisches Signal in einzelnen Zellen	negativ	deutliches zytosolisches Signal in einigen BNC, bes. in Karunkelepithel-nähe oder bei eingewanderten BNC
	Rd 24	169-171	negativ bis auf geringgradige parazelluläre Braunschleier	negativ bis auf geringgradige parazelluläre Braunschleier	deutliches zytosolisches Signal in einzelnen Endothelzellen	schwaches zytosolisches Signal in einzelnen BNC
Geburt	G 2	109-111	geringgradige parazelluläre Braunschleier, sonst negativ			
	G 4	121-123	parazelluläre Braunschleier und schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in einzelnen Trophoblastzellen			
	G 5	58-60	negativ			vereinzelte parazelluläre Reaktionen im Bereich des Trophoblasten, einzelne erhaltene BNC schwaches zytosolisches oder nukleäres Signal

9.2.2 Immunhistologischer Nachweis der Wachstumsfaktor-Rezeptoren

9.2.2.1 Nachweis des FGF-Rezeptors

**Tabelle 14: Darstellung der Ergebnisse des immunhistologischen FGF-Rezeptor-Nachweises incl. der Ergebnisse der Negativkontrollen mit Nonsens-AK und des Positivgewebes;
Zusammenfassung der Ergebnisse der Tiere**

Grav.-stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel-epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 150	Rd 21	4-12	schwaches bis deutliches membranständiges/ zytosolisches Signal an einigen Stromazellen es treten auch negative Regionen auf genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	negativ	sehr schwaches bis deutliches nukleäres und perinukleäres Signal in einigen Stromazellen es treten auch negative Regionen auf genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis deutliches parazelluläres, membranständiges/ zytosolisches Signal an einigen Zellen

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel- epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 150	Rd 22	88-96	schwaches bis deutliches membranständiges/ zytosolisches Signal an einigen Stromazellen, teilweise gleichzeitig schwaches nukleäres Signal in diesen Zellen es treten auch negative Regionen auf genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	negativ	sehr schwaches bis deutliches nukleäres und perinukleäres Signal in einzelnen Stromazellen es treten auch negative Regionen auf genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis deutliches parazelluläres, membranständiges/ zytosolisches Signal an vielen Zellen
	Rd 23	136-144	schwaches bis deutliches membranständiges/ zytosolisches Signal an vielen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	kein eindeutiger Unterschied zur Negativ- kontrolle, daher als NEGATIV beurteilt	sichtbare Anteile negativ	schwaches bis intensives parazelluläres, membranständiges/ zytosolisches Signal an nahezu allen Zellen
Tag 220	Rd 14	28-36	deutliches bis intensives membranständiges/ zytosolisches Signal an vielen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	negativ	schwaches bis intensives perinukleäres Signal in einigen Stromazellen, es treten auch negative Regionen auf genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis deutliches parazelluläres, membranständiges/ zytosolisches Signal an vielen Zellen
	Rd 15	40-48	schwaches bis intensives membranständiges/ zytosolisches Signal an nahezu allen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	negativ	schwaches bis deutliches perinukleäres Signal in einzelnen Stromazellen es treten auch negative Regionen auf genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives parazelluläres, membranständiges/ zytosolisches Signal an vielen Zellen
	Kuh 3	100-108	schwaches bis deutliches membranständiges/ zytosolisches Signal an vielen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	kein eindeutiger Unterschied zur Negativ- kontrolle, daher als NEGATIV beurteilt	schwaches nukleäres und perinukleäres Signal in einzelnen Stromazellen es treten auch negative Regionen auf genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis deutliches parazelluläres, membranständiges/ zytosolisches Signal an einigen Zellen, überlappend schwaches nukleäres Signal in einzelnen Zellen Signale treten besonders in der Nähe großer Stromastraßen auf

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel- epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 240	Rd 16	148-156	deutliches membranständiges/ zytosolisches Signal an allen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches zytosolisches Signal in nahezu allen Zellen, überlappend schwaches nukleäres Signal in vielen Zellen	schwaches bis deutliches nukleäres und perinukleäres Signal in einzelnen Stromazellen es treten auch negative Regionen auf genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	deutliches bis intensives parazelluläres, membranständiges/ zytosolisches Signal an nahezu allen Zellen
	Rd 19	64-72	schwaches membranständiges/ zytosolisches Signal an einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches zytosolisches Signal in vielen Zellen, überlappend schwaches nukleäres Signal in einigen Zellen es treten auch negative Regionen auf	schwaches bis deutliches nukleäres und perinukleäres Signal in einzelnen Stromazellen es treten auch negative Regionen auf genaue Zelldifferenzierung nicht immer möglich	deutliches bis intensives parazelluläres, membranständiges/ zytosolisches Signal an vielen Zellen
	Rd 20	160-168	schwaches bis deutliches membranständiges/ zytosolisches Signal an einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches zytosolisches Signal in vielen Zellen, überlappend schwaches nukleäres Signal in vielen Zellen es treten auch negative Regionen auf	schwaches bis deutliches nukleäres und perinukleäres Signal in einzelnen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	deutliches bis intensives parazelluläres, membranständiges/ zytosolisches Signal an nahezu allen Zellen
Tag 270	Rd 17	52-60	schwaches bis deutliches membranständiges/ zytosolisches Signal an einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	negativ	schwaches bis deutliches nukleäres und perinukleäres Signal in einigen Stromazellen es treten auch negative Regionen auf genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis intensives parazelluläres, membranständiges/ zytosolisches Signal an vielen Zellen
	Rd 18	172-180	schwaches membranständiges/ zytosolisches Signal an einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches zytosolisches Signal in einigen Zellen, überlappend schwaches nukleäres Signal in einigen Zellen	schwaches perinukleäres Signal in einzelnen Stromazellen es treten auch negative Regionen auf genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	deutliches bis intensives parazelluläres, membranständiges/ zytosolisches Signal an nahezu allen Zellen

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel- epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 270	Rd 24	76-84	schwaches bis intensives membranständiges/zytosolisches Signal an einigen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches zytosolisches Signal in einzelnen Zellen, überlappend schwaches nukleäres Signal in einzelnen Zellen	schwaches bis deutliches nukleäres und perinukleäres Signal in einigen Stromazellen es treten auch negative Regionen auf genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	deutliches bis intensives parazelluläres, membranständiges/zytosolisches Signal an vielen Zellen
Geburt	G 3	16-24	kein eindeutiger Unterschied zur Negativkontrolle, daher als NEGATIV beurteilt	nicht mehr eindeutig abgrenzbar	schwaches nukleäres und perinukleäres Signal in einzelnen Stromazellen (NUR IN CHORION-NÄHE!) genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	deutliches bis intensives parazelluläres, membranständiges/zytosolisches Signal an allen Zellen
	G 4	124-132	schwaches bis deutliches membranständiges/zytosolisches Signal an vielen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	nicht mehr eindeutig abgrenzbar	schwaches bis deutliches nukleäres und perinukleäres Signal in einzelnen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	deutliches bis intensives parazelluläres, membranständiges/zytosolisches Signal an nahezu allen Zellen
	G 5	112-120	kein eindeutiger Unterschied zur Negativkontrolle, daher als NEGATIV beurteilt	nicht mehr eindeutig abgrenzbar	sichtbare Anteile negativ	schwaches bis deutliches parazelluläres, membranständiges/zytosolisches Signal an vielen Zellen
Positiv-gewebe	Cor	181-183	deutliches bis intensives zytosolisches Signal in allen Zellen und allen Schichten			
Negativkontrollen mit monoklonalem Maus IgMκ gegen TNP-KLH						
Positiv-gewebe	Cor	184-186	negativ			
Tag 150	Rd 21	1-3	schwacher Braunschleier in mat. Stroma und epithelialen Anteilen			
	Rd 22	85-87	nur geringgradiger Braunschleier im gesamten Präparat			
	Rd 23	133-135	schwacher Braunschleier in mat. Stroma und epithelialen Anteilen			
Tag 220	Rd 14	25-27	schwacher Braunschleier in mat. Stroma und epithelialen Anteilen			
	Rd 15	37-39	schwacher Braunschleier in mat. Stroma und epithelialen Anteilen			
	Kuh 3	97-99	schwacher Braunschleier in mat. Stroma und epithelialen Anteilen			
Tag 240	Rd 16	145-147	negativ			
	Rd 19	61-63	schwacher Braunschleier in mat. Stroma und epithelialen Anteilen			
	Rd 20	157-159	schwacher Braunschleier in mat. Stroma und epithelialen Anteilen			

Grav.-stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel-epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 270	Rd 17	49-51	schwacher Braunschleier in mat. Stroma und epithelialen Anteilen			
	Rd 18	169-171	schwacher Braunschleier in mat. Stroma und epithelialen Anteilen			
	Rd 24	73-75	schwacher Braunschleier in mat. Stroma und epithelialen Anteilen			
Geburt	G 3	13-15	schwacher Braunschleier in mat. Stroma und epithelialen Anteilen			
	G 4	121-123	schwacher Braunschleier in mat. Stroma und epithelialen Anteilen			
	G 5	109-111	schwacher Braunschleier in mat. Stroma und epithelialen Anteilen			

9.2.2.2 Nachweis des EGF-Rezeptors

**Tabelle 15: Darstellung der Ergebnisse des immunhistologischen Nachweises des EGF-Rezeptors incl. der Ergebnisse der Negativkontrollen mit Nonsens-AK und des Positivgewebes;
Zusammenfassung der Ergebnisse der Tiere**

Grav.-stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel-epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 150	Rd 21	4-12	negativ	intensives parazelluläres, membranständiges halbmondförmiges Signal an einigen einzelnen Zellen zum Trophoblasten hin intensives parazelluläres, membranständiges Signal an allen Zellen einzelner Zottenquerschnitte schwaches zytosolisches Signal in allen anderen Zellen	negativ	intensives parazelluläres, membranständiges Signal an allen Zellen einzelner Zottenquerschnitte schwaches zytosolisches Signal in allen anderen Zellen
	Rd 22	16-24	schwaches nukleäres Signal in einzelnen Stromazellen <small>genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich</small>	schwaches zytosolisches Signal in nahezu allen Zellen	schwaches nukleäres Signal in einzelnen Endothelzellen	schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in nahezu allen Zellen
	Rd 23	28-36	negativ	schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in allen Zellen	schwaches nukleäres Signal in einzelnen Endothelzellen	schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in nahezu allen Zellen
Tag 220	Rd 14	40-48	negativ	deutliches bis intensives parazelluläres, membranständiges halbmondförmiges Signal an einzelnen Zellen zum Trophoblasten hin	negativ	negativ

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel­epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 220	Rd 15	52-60	negativ	intensives parazelluläres, membranständiges halbmond- bis ringförmiges Signal an einzelnen und auch an mehreren benachbarten Zellen verschiedener Zottenquerschnitte zum Trophoblasten hin auch mit zytosolischer Beteiligung	negativ	negativ
	Kuh 3	64-72	negativ	deutliches bis überwiegend intensives parazelluläres, membranständiges halbmond- bis ringförmiges Signal an einigen einzelnen und benachbarten Zellen verschiedener Zottenquerschnitte zum Trophoblasten hin auch mit zytosolischer Beteiligung	negativ	negativ
Tag 240	Rd 16	76-84	negativ	schwaches bis intensives parazelluläres, membranständiges halbmond- bis ringförmiges Signal an einzelnen Zellen verschiedener Zottenquerschnitte zum Trophoblasten hin schwaches zytosolisches Signal in allen anderen Zellen	negativ	schwaches zytosolisches Signal in nahezu allen Zellen
	Rd 19	88-96	schwaches zytosolisches Signal in einzelnen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	deutliches bis intensives parazelluläres, membranständiges halbmond- bis ringförmiges Signal an einzelnen Zellen verschiedener Zottenquerschnitte zum Trophoblasten hin schwaches zytosolisches Signal in allen anderen Zellen	negativ	schwaches zytosolisches Signal in nahezu allen Zellen

Grav.- stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkel­epithel	fetales Stroma	Trophoblast
Tag 240	Rd 20	100-108	negativ	intensives parazelluläres, membranständiges halbmondförmiges Signal an einzelnen Zellen verschiedener Zottenquerschnitte zum Trophoblasten hin schwaches zytoplasmisches Signal in allen anderen Zellen schwaches nukleäres Signal in einzelnen anderen Zellen	negativ	schwaches zytoplasmisches Signal in allen Zellen
Tag 270	Rd 17	112-120	negativ	intensives parazelluläres, membranständiges halbmond- bis ringförmiges Signal (bes. zum Trophoblasten hin!) an nahezu allen Zellen nahezu aller Zottenquerschnitte girlandenförmige Signale schwaches zytoplasmisches Signal in allen anderen Zellen	negativ	schwaches zytoplasmisches Signal in nahezu allen Zellen schwaches nukleäres Signal in einzelnen BNC
	Rd 18	124-132	schwaches bis deutliches zytoplasmisches Signal in einzelnen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches zytoplasmisches Signal in vielen Zellen	negativ	schwaches zytoplasmisches Signal in vielen Zellen
	Rd 24	136-144	negativ			
Geburt	G 3	148-156	gleiches Reaktions- muster wie in Negativkon- trolle, daher als NEGATIV beurteilt	deutliches schnurartiges Signal im Bereich der fetomaternalen Kontaktzone sieht wie Überreste einer girlandenförmigen Reaktion (z.B.: Rd 17) aus Zellen selbst nicht mehr eindeutig abgrenzbar	gleiches Reaktions- muster wie in Negativ- kontrolle, daher als NEGATIV beurteilt	gleiches Reaktionsmuster wie in Negativkontrolle, daher als NEGATIV beurteilt

Grav.-stadium	Tier	Bilder	Auswertung			
			maternales Stroma	Karunkelepithel	fetales Stroma	Trophoblast
Geburt	G 4	160-168	schwaches zytosolisches Signal in einigen Stromazellen schwaches nukleäres Signal in einigen anderen Stromazellen	nicht mehr eindeutig abgrenzbar	schwaches nukleäres Signal in einzelnen Stromazellen genauere Zelldifferenzierung nicht immer möglich	schwaches bis deutliches zytosolisches und parazelluläres Signal an allen Zellen schwaches nukleäres Signal in einigen Zellen
	G 5	172-180	gleiches Reaktionsmuster wie in Negativkontrolle, daher als NEGATIV beurteilt			
Positiv-gewebe	Mam-ma-tumor		deutliches nukleäres Signal in nahezu allen Bindegewebszellen, vereinzelt auch Endothelzellen deutliches nukleäres Signal, schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in allen epithelialen Zellen, überlappend mit parazellulärem membranständigem Signal einiger epithelialer Zellen, vereinzelt deutliches nukleäres Signal in epithelialen Zellen			
Negativkontrollen mit monoklonalem Maus IgG1κ gegen Clostridium perfringens-Toxin						
Positiv-gewebe	Mam-ma-tumor		negativ			
Tag 150	Rd 21	1-3	negativ			
	Rd 22	13-15	negativ			
	Rd 23	25-27	negativ			
Tag 220	Rd 14	37-39	negativ			
	Rd 15	49-51	negativ			
	Kuh 3	61-63	negativ			
Tag 240	Rd 16	73-75	negativ			
	Rd 19	85-87	negativ			
	Rd 20	97-99	negativ			
Tag 270	Rd 17	109-111	negativ			
	Rd 18	121-123	negativ			
	Rd 24	133-135	negativ			
Geburt	G 3	145-147	schwaches bis deutliches zytosolisches Signal in einzelnen Stromazellen	nicht mehr eindeutig abgrenzbar	nicht eindeutig abgrenzbar	schwaches parazelluläres und zytosolisches Signal an nahezu allen Zellen
	G 4	157-159	negativ, bis auf einige Ausflockungen und geringgradiges Signal parazellulär am Trophoblasten			
	G 5	169-171	deutliches zytosolisches Signal in einzelnen Stromazellen	nicht mehr eindeutig abgrenzbar	negativ	schwaches bis deutliches parazelluläres und zytosolisches Signal an nahezu allen Zellen

10 Danksagung

- ◆ Bei Allen, die dazu beigetragen haben, das Gelingen dieser Arbeit durch ihre zahlreichen kleinen wie großen Hilfen zu ermöglichen, möchte ich mich ganz herzlich bedanken.
- ◆ Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. B. Hoffmann danke ich für die Überlassung des Themas und die gewährte Unterstützung bei der Durchführung, Abfassung und Korrektur dieser Arbeit.
- ◆ Herrn Prof. Dr. R. Leiser (Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und – Embryologie der Universität Giessen) und seinen Mitarbeitern danke ich für ihre Unterstützung, ihr Interesse und die fachlichen Anregungen.
- ◆ Bei Prof. Dr. D. Schams, Weihenstephan, und Prof. Dr. L. Wieler, Berlin, möchte ich mich für die Bereitstellung der Antikörper bedanken.
- ◆ Bei den Kollegen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Hoffmann möchte ich mich herzlichst für die gute Zusammenarbeit, das nette Arbeitsklima, die moralische wie tatkräftige Unterstützung und die Erledigung zahlreicher “Gänge vor Ort” bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau A. Rostalski, die mir durch ihre Freundschaft und ihren allgegenwärtigen Humor das tägliche Arbeiten ungemein erleichtert hat, und Herrn F. Büsges, der mir bes. im Anfang bei allen Fragen und Problemen stets hilfreich, offen und geduldig mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.
- ◆ Herrn G. Nöker und Herrn L. Bludau danke ich herzlich für ihre Unterstützung beim Ausdruck der Dissertation und das damit verbundene Vertrauen.
- ◆ Bei Herrn I. Schörmann bedanke ich mich herzlich für die bereitwillige und häufige Überlassung diverser Hardware-Komponenten.
- ◆ Der Firma M3b, insbesondere den Herren L. Voss, M. Deitmerg und Ch. Walzel, die mir gegen die übelsten Tücken des Computers mutig zur Seite standen und damit gerettet haben, was zu retten war, sei hier mein tiefer Dank ausgesprochen.
- ◆ Ebenso gilt mein Dank meiner Schwester M. Cirolì, welche stets Zeit und neue Ideen für die Lösung meiner Computerprobleme hatte, für ihre Hilfe beim Arbeiten mit dem PC.
- ◆ Meinem Bruder M. Weise und seiner Frau F. Dominguez, danke ich sehr für die schnelle und unkomplizierte Hilfe bei der Übersetzung der Zusammenfassung.
- ◆ Meinen Eltern möchte ich ganz besonders herzlich für alle ihre Aufwendungen, die weit über eine Ausbildung hinausgehende finanzielle Unterstützung, sowie für die Gewißheit, stets alle notwendige Hilfe zu bekommen, danken.
- ◆ Ebenso gebührt meinem Ehemann, der mit Gleichmut alle Krisen ertragen hat, niemals an mir zweifelte oder gar verzweifelte, für seine schier unendliche Geduld und den unerschütterlichen Glauben an das gute Ende, mein besonderer Dank.
- ◆ Mein besonderer Dank gilt der Akademie für Tiergesundheit (AfT), die durch die Bereitstellung eines persönlichen Stipendiums diese Studie unterstützt haben.
- ◆ Diese Arbeit wurde durch Sachmittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.